



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**BRUNO CÉSAR BRITO DIAS**

**UTILIZAÇÃO DO EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA O**  
**ACARÁ SEVERO *Heros severus* (Heckel, 1840)**

**Belém**  
**2016**

**BRUNO CÉSAR BRITO DIAS**

**UTILIZAÇÃO DO EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA O  
ACARÁ SEVERO *Heros severus* (Heckel, 1840)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Ecologia Aquática e Aquicultura  
Orientador: Prof. Dr. Rauquírio André Albuquerque Marinho da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Galileu Crovatto Veras

**Belém  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Dias, Bruno César Brito, 1989-

Utilização do eugenol como anestésico para o acará  
severo *Heros severus* (Heckel, 1840) / Bruno César Brito  
Dias. - 2016.

Orientador: Rauquírio André Albuquerque  
Marinho da Costa;

Coorientador: Galileu Crovatto Veras.

Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal do Pará, Campus de Castanhal, Programa  
de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2016.

1. Anestesia veterinária. 2. Peixe  
ornamental. 3. Ciclídeos. 4. Eugenol. I. Título.

CDD 22. ed. 636.089796

---

**BRUNO CÉSAR BRITO DIAS**

**UTILIZAÇÃO DO EUGENOL COMO ANESTÉSICO PARA O  
ACARÁ SEVERO *Heros severus* (Heckel, 1840)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.  
Área de concentração: Ecologia Aquática e Aquicultura.

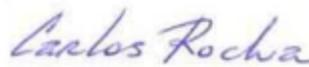
Data da aprovação. Belém - PA: 20/07/2016

Banca Examinadora



---

Prof. Dr. Galileu Crovatto Veras (Co-orientador)  
IECOS/UFPA



---

Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha  
(Membro Titular) – IFPA/Belém



---

Prof. Dr. Marcos Ferreira Brabo (Membro Titular)  
– IECOS/UFPA



---

Prof. Dr. Daniel Abreu Vasconcelos Campelo  
(Membro Titular) – IECOS/UFPA

*Ao meu avô, Benedito Tavares Brito, com  
todo amor e admiração.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar minha vida e abençoar minha trajetória.

Aos meus pais Rosângela Costa Brito e César Augusto Gonçalves Dias, e aos meus irmãos, Ana Beatriz Brito Dias e Pedro Sergio Brito Dias, pelo amor incondicional, amizade fraterna, apoio, por tudo que fazem por mim, pela simplicidade, exemplo, amizade e carinho, foram fundamentais na construção do meu caráter.

Um agradecimento muito especial a minha namorada, Luciene Diniz dos Santos. Muito obrigado por estar ao meu lado durante essa caminhada, você me fez sentir mais forte com muita coragem para chegar até o fim e querer sempre ir mais além, eu amo você!!!

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, professor Dr. Rauquírio André Albuquerque Marinho da Costa, muito obrigado pela confiança e pela oportunidade que me foi dada.

Ao meu co-orientador, Dr. Galileu Crovatto Veras. Professor foi um prazer trabalhar com o senhor durante esses últimos anos. Muito obrigado pela orientação, pela amizade sincera e pela confiança depositada, sou extremamente grato por tudo que o senhor tem feito por mim.

Aos professores Dr. Marcos Ferreira Brabo e Dr. Daniel Abreu Vasconcelos Campelo, pelos conselhos, palavras de incentivo e principalmente pela disponibilidade e presença sempre que precisei. Muito obrigado!

Um agradecimento muito especial a Aline do Rosário Pinheiro e Pinheiro, muito obrigado pela amizade ao longo desses últimos anos.

Aos amigos do Laboratório de Piscicultura que durante muitas horas me ajudaram na realização dos vários experimentos: Eliene dos Reis Rodrigues, Lourdes Marília Oliveira Soares, Luciene Diniz dos Santos, Daércio José de Macedo Ribeiro Paixão e Odnilson Pereira Marin.

Aos amigos do mestrado, Adriana Xavier Alves, Juliette do Socorro Pereira Pantoja, Bruno José Corecha Fernandes Eiras, Márcio José Macêdo da Silva e Jonathan Alves de Sousa.

Aos demais amigos e a todos outros não citados, mas, que de alguma forma colaboram com este trabalho, MUITO OBRIGADO!!!

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre ombros de gigantes”.*

***Isaac Newton***

## RESUMO

Foram realizados dois diferentes trabalhos, utilizando o eugenol como anestésico para o acará severo *Heros severus*. Ambos realizados no Laboratório de Peixes Ornamentais da Universidade Federal do Pará, *Campus* de Bragança. No primeiro trabalho, objetivou-se analisar a eficiência do eugenol como anestésico para duas classes de tamanho, alevinos e adultos do acará severo e verificar qual a dose mais eficiente no tempo de indução e recuperação à anestesia. Foram utilizados 120 indivíduos de *H. severus*, alevinos (n=60) e adultos (n=60). Os alevinos foram selecionados em tamanhos homogêneos e transferidos aleatoriamente para seis aquários de 60 L, da mesma forma os adultos para seis aquários de 200L, ambos em densidade de estocagem de 10 exemplares por aquário. Realizou-se os experimentos em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos, concentrações de eugenol (50; 75; 100; 125; 150 e 175 Mg L<sup>-1</sup>) e 10 repetições, sendo o peixe a unidade experimental. Com base nos resultados encontrados, recomenda-se para os alevinos a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, para realização de manejos de curta e de longa duração. Para os adultos, recomenda-se a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> para procedimentos de curta duração e 75 Mg L<sup>-1</sup> para procedimentos de longa duração. Com o segundo trabalho objetivou-se avaliar as respostas fisiológicas de adultos de acará severo anestesiados com a concentração ideal do eugenol encontrada no experimento anterior. Para realização do ensaio foi utilizado um total de 60 adultos de acará severo. Os peixes foram dispostos de maneira individual em 60 aquários de 60L contendo 45L de água. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, com cinco repetições, sendo o peixe a unidade experimental. Para verificar a ocorrência da influência do eugenol sobre os parâmetros fisiológicos e hematológicos do acará severo, coletou-se sangue dos peixes submetidos a três diferentes protocolos de procedimentos: anestesiado (peixes expostos a 75 mgL<sup>-1</sup> de eugenol durante 133s); anestesia simulada (peixes submetidos a uma simulação do banho anestésico, também por 133 s, sem adição do anestésico); e controle (peixes mantidos no aquário sem manuseio e exposição ao anestésico). Para cada procedimento foram realizadas quatro amostragens de sangue em diferentes tempos: 0 (imediatamente após o procedimento), 6, 12 e 24h. A retirada da amostra sanguínea foi feita por punção do vaso caudal. Em seguida procedeu-se com a realização das seguintes análises: glicose, hematócrito (Ht), proteína total (Pt), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (Er), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), triglicerídeos (TGR) e colesterol (COL). A exposição de adultos de acará severo a

anestesia com eugenol na concentração ideal de  $75 \text{ mgL}^{-1}$  por 133 segundos, causou alterações nos valores das variáveis, glicose, Ht, Pt, Hb, Er, VCM, HCM, CHCM, COL e TRI. Os resultados obtidos com os dois trabalhos mostram que o eugenol foi eficiente em induzir alevinos e adultos de acará severo ao estágio de anestesia e a concentração considerada ideal para anestesia dos adultos foi suficiente para causar alterações nas variáveis analisadas, desencadeando respostas fisiológicas características do estresse.

**Palavras-Chave:** Peixe ornamental. Ciclídeos Amazônico. Anestesia Profunda. Hematologia. Estresse.

## ABSTRACT

Thus, two different studies were conducted using eugenol as an anesthetic for severe discus *Heros severus*. Both studies were conducted in Tropical Fish Laboratory of the School of Coastal Studies Institute of Fisheries Engineering, Federal University of Pará, *Campus* de Bragança. In the first study aimed to analyze the efficiency of eugenol as an anesthetic for two size classes, fingerlings and adult severe discus and find what the most effective dose in time of induction and recovery of anesthesia. Were used 120 individuals of *H. severus*, fingerlings (n=60) and adults (n=60). The fingerlings were selected randomly in homogeneous sizes and transferred to six tanks of 60 L, as adults for six aquariums 200L, both at 10 copies per aquarium stocking density. We conducted the experiments in a completely randomized design with six treatments, eugenol concentrations (50; 75; 100; 125; 150 and 175 Mg L<sup>-1</sup>) and 10 repetitions, and the fish the experimental unit. Based on the findings is recommended for fry concentration of 50 mg L<sup>-1</sup> to perform handlings short or long term and for adults, it is recommended that the concentration of 50mg L<sup>-1</sup> for short procedures duration and 75 mgL<sup>-1</sup> for long procedures. In the second study aimed to evaluate the physiological responses of acará severo adults anesthetized with the ideal concentration of eugenol found in the previous experiment. To perform the assay was used a total of 60 adult severe discus. The fish were placed individually in 60 60L aquariums containing 45L of water. We used a completely randomized design in a factorial 3 x 4 with five repetitions, and the fish the experimental unit. To verify the occurrence of eugenol influence on the physiological and hematological parameters of banded cichlid, was collected the blood of fish subjected to three diferentes protocols procedures anaesthetized (fish exposed to 75 mg L<sup>-1</sup> of eugenol during 133 s); simulated anesthesia (fish subjected to a sumulation of anesthetic bath, also for 133 s, with only water and without adding the anesthetic); and control (fish kept in the aquarium without handing and exposure to anesthetic). For each procedure, there were four blood samplings at different times: 0 (immediately after procedure), 6, 12 and 24 h. The withdrawal of the blood sample was taken by puncture from the flow vessel with the held of needles and syringes 1 ml pre-moistened with EDTA 10%. Then were proceeded to carry out folloying analyzes: glucose, hematocrit, (Ht), total protein (Tp), hemoglobin (Hb), number of erythrocytes (Er), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), triglycerides (TGR), and cholesterol (COL). The banded cichlid adult exposure to anesthesia with eugenol in the ideal concentration of 75 mg L<sup>-1</sup> by 133 seconds was enough to cause changes in the values of variables, glucose, Ht, Pt, Hb, Er,

MCV, MCH, MCHC, COL and TRI. The results from the two studies show that eugenol was effective in inducing fry and adult severe discus to deep anesthesia stage stage in all tested concentrations and the concentration considered ideal for anesthesia of adults was enough to cause changes in the variables analyzed, triggering physiological responses characteristics of stress.

**Key words:** Ornamental fish. Cichlid Amazonian. Deep anesthesia. Hematology. Stress

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1. GERAL.....	14
2.2. ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
3.1. ANESTÉSICOS PARA PEIXES .....	16
3.2. EUGENOL .....	17
3.3. ESTRESSE EM PEIXES .....	18
3.4. PANORAMA DA PISCICULTURA ORNAMENTAL .....	20
3.5. O ACARÁ SEVERO .....	21
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO II - EUGENOL COMO ANESTÉSICO NO MANEJO DO PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO ACARÁ SEVERO <i>Heros severus</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO III - RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DO PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO ACARÁ SEVERO <i>Heros severus</i>, ANESTESIADO COM EUGENOL .....</b>	<b>46</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>

## **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A “aquariofilia” ou “aquarismo” consiste na atividade de manutenção de organismos aquáticos em ambientes fechados como, aquários, caixas plásticas ou em outros materiais para fins de ornamentação. Os peixes, por apresentarem grande variedade de coloração, formas e ocuparem diferentes habitats, chamam a atenção dos consumidores, e por isso são as espécies mais utilizadas na aquariofilia.

No mundo, os asiáticos são os maiores produtores e exportadores de peixes ornamentais. Cingapura lidera o ranking como maior exportador em 2006, seguido por Malásia, Indonésia, Sri Lanka e Filipinas, que juntas somaram mais de 118 milhões de dólares exportados pelo sudeste asiático. As principais espécies nativas oriundas da aquicultura cultivadas nessa região são o beta *Beta splendens*, beijador *Helostoma temminckii*, tricogaster *Trichogaster trichopterus*, barbo-tigre *Puntius tetrazona* e pangassius *Pangasius sutchi*. Já as principais espécies exóticas criadas são os tetras, pecilídeos (guppies, molinésias e espadas), kinguio e ciclídeos, como o acará disco *Symphysodon aequifasciatus* (RIBEIRO, 2008).

A América do Sul destaca-se por sua abundante diversidade natural existente na região amazônica e pelo grande potencial das espécies para aquariofilia, como o acará severo *Heros severus* (HECKEL, 1840). A espécie é encontrada em toda a Amazônia brasileira, parte norte da Guiana, na Bacia do Orinoco da Venezuela, e na drenagem Tocantins no Brasil (KULLANDER, 1986). Os exemplares selvagens apresentam uma coloração verde na região dorsal com uma coloração mais amarelo ouro na parte ventral. Apresentam oito faixas verticais pretas distintas, distribuídas de forma equidistante ao longo dos seus lados. Os indivíduos dessa espécie apresentam o corpo achatado lateralmente, com padrão de cores diversas e intensas, distribuídas ao longo de todo o corpo do animal.

No ramo da aquariofilia, o Brasil atua como grande exportador de peixes ornamentais devido aos milhões de peixes que são coletados na Bacia Amazônica, em especial na região de Barcelos-AM, onde uma fatia representativa da economia do município são atribuídas à pesca de peixes ornamentais (CHAO et al., 2001). O país, apesar de ser reconhecido como exportador de peixes ornamentais, possui poucas publicações científicas sobre este assunto, sendo a maioria relacionada a peixes marinhos (IBAMA, 2008).

A ausência de produção técnica e científica sobre o assunto reflete deficiências, como a falta de protocolos de manejo, reprodução, nutrição e bem estar desses indivíduos em laboratório. A manutenção do bem estar animal e a tentativa de se evitar a instalação de um

quadro de estresse crônico é um dos maiores desafios na piscicultura ornamental, frente aos diversos agentes estressores inerentes ao cultivo desses organismos. Nesse sentido, a utilização de anestésicos tem se tornado uma ferramenta cada vez mais comum na piscicultura ornamental, por possibilitar com mais tranquilidade a realização de inúmeras operações como: biometrias, transporte, repicagem e coletas de sangue (JAVAHERY et al., 2012; SNEDDON, 2012; BITTENCOURT et al, 2013).

Atualmente, muitos produtos químicos são utilizados como anestésicos para peixes, entre eles, os mais comuns são a tricáína metanosulfato (MS-222), a quinaldina e o eugenol (VELISEK et al., 2011). O eugenol (metoxifenol 4-alil-2) é o princípio ativo encontrado no óleo de cravo, derivado do caule, folhas e flores da árvore *Eugenia caryophyllata*. O eugenol pode compreender 70-90% em peso do óleo de cravo (JAVAHERY et al., 2012). Entre as várias vantagens do uso do eugenol, destaca-se o fato do composto ser facilmente adquirido no mercado, apresentar baixo custo, além de ser seguro para o meio ambiente e o manipulador. Assim, por conta de sua comprovada eficiência e suas vantagens operacionais citadas anteriormente, a cada dia vem aumentando a utilização do eugenol como anestésico para peixes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Verificar a eficiência do eugenol como anestésico para duas classes de tamanho (alevinos e adultos) do peixe ornamental amazônico acará severo (*H. severus*) e verificar as respostas hematológicas e fisiológicas de adultos de acará severo, expostos a concentração e o tempo de exposição ideal encontrado anteriormente.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Testar, entre várias concentrações de eugenol, qual apresenta melhor tempo de indução e recuperação anestésica.
- Analisar a ação do anestésico, na concentração recomendada anteriormente, sobre:
  - ✓ Variáveis hematológicas: número de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina total;
  - ✓ Índices hematimétricos: volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média;

- ✓ Parâmetros fisiológicos: glicose, proteína plasmática total, triglicerídeos e colesterol.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. ANESTÉSICOS PARA PEIXES

O primeiro relato do uso de anestésicos em peixe é da década de 1930. Desde então, foram estudados diversos agentes químicos e diferentes procedimentos para insensibilização de peixes. A partir disso, tornou-se possível a realização com maior tranquilidade de uma serie de operações básicas presentes no dia a dia de uma piscicultura.

Os anestésicos são administrados via imersão dos peixes em solução anestésica. O agente é captado pelas brânquias, principal rota de absorção e eliminação de anestésicos, difundindo-se para o sangue, que o conduz até o sistema nervoso central (ROSS & ROSS, 2008).

As substâncias anestésicas, quando presentes no corpo dos peixes, podem levar a sedação, anestesia cirúrgica ou morte, dependendo da combinação, da dose e do tempo de exposição dos animais. Os estágios progressivos de anestesia foram descritos por Mc Farland (1959). A base de seu esquema descritivo está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Estágios de anestesia em peixes.

<b>Estágios</b>	<b>Fases</b>	<b>Sinais fisiológicos e comportamentais</b>
<b>I</b>	Sedação	Responsivo aos fortes estímulos, porém com o movimento reduzido e diminuição da ventilação.
<b>II</b>	Anestesia leve	Perda parcial de equilíbrio; forte analgesia; perda total do tônus muscular, perda total da ventilação das brânquias e equilíbrio quase ausente.
<b>III</b>	Anestesia profunda ou cirúrgica	Perda total de reação, mesmo a fortes estímulos.
<b>IV</b>	Colapso Medular	Parada respiratória, parada cardíaca, eventual morte, overdose.

Fonte: Mc Farland (1959)

Em geral, os peixes se encaixam perfeitamente na descrição feita anteriormente para os estágios de anestesia. No entanto, cada uma dessas fases possui uma variação de tempo que depende da espécie estudada, da droga utilizada, do tempo de contato e do estado fisiológico do peixe no momento da indução. Em suma, a indução deve ser rápida e com baixa ou nenhuma hiperatividade acentuada (ROSS & ROSS, 2008).

Um anestésico eficiente deve produzir anestesia no máximo em três minutos, com tempo de recuperação de até cinco minutos, devendo ser eficaz em baixas concentrações e apresentar toxicidade em doses muito superiores às efetivas (MARKING & MEYER, 1985; ROSS & ROSS, 2008). Também deve ser seguro aos peixes, aos seres humanos e ao ambiente, apresentando baixa concentração residual nos tecidos, baixo custo, facilidade de uso, disponibilidade e tipo de procedimento (MARKING & MEYER, 1985; JAVAHERY et al., 2012). Além disso, deve-se ter o conhecimento prévio das doses a serem utilizadas, evitando desperdícios financeiros e morte dos peixes (ROUBACH & GOMES, 2001; PARK et al., 2008; JAVAHERY et al., 2012).

Atualmente, muitos produtos químicos são utilizados como anestésico para peixes. No Brasil o MS-222 (tricafina metano sulfonato), a benzocafina (ethyl-p-aminobenzoato), a quinaldina (2-4-metilquinolina) ou a quinaldina sulfato (sulfato de 2-4-metilquinolina), o 2-fenoxietanol (Sigma®), o etileno glicol éter fenil éter – C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> (Merck®), o mentol e o Eugenol são os anestésicos mais utilizados. Porém, não existe legislação que regulamente o uso destes produtos para peixes no país. Por essa razão são adotadas as recomendações da Food and Drug Administration (FDA), que aprova o uso do MS-222 em peixes destinados ao consumo humano nos Estados Unidos (ROUBACH & GOMES, 2001; NOCHETTO et al., 2009).

### 3.2. EUGENOL

O eugenol (metoxifenol 4-alil-2) é o princípio ativo encontrado no óleo de cravo, que é derivado do caule, folhas e flores da árvore *Eugenia caryophyllata*. O eugenol pode compreender 70-90% em peso do óleo de cravo (JAVAHERY et al., 2012). O mesmo tem sido utilizado como um anestésico tópico leve desde a antiguidade e para ajudar com a dor de dente, dores de cabeça e dores nas articulações.

É um agente anestésico facilmente encontrado no mercado, que vem sendo utilizado em centros de pesquisa e estações de piscicultura. O eugenol tem se mostrado eficaz, apresenta baixo custo de aquisição, é considerado adequado para o meio ambiente e seguro para os manipuladores, sem riscos aparentes de intoxicação (ROUBACH et al., 2005; INOUE et al., 2003; IVERSEN et al., 2003).

Devido à eficácia do produto como anestésico, recentemente o eugenol vêm sendo alvo de estudo com algumas espécies de peixes de interesse econômico, tanto ornamentais quanto de corte, como o acará bandeira *Pterophyllum scalare* (MITJANA et al., 2014), oscar

*Astronotus ocellatus* (SILVA-SOUZA et al., 2015), acará *Geophagus brasiliensis* (ROCHA et al., 2015), tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (DELBON et al., 2012; SIMÕES et al., 2012), tambaqui *Colossoma macropomun* (INOUE et al., 2011), esturjão siberiano *Acipenser baerii* (GOMULKA et al., 2008) e o esturjão russo *Acipenser gueldensaedtii* (GOMULKA et al., 2015). Além de sua utilização como anestésico, tem-se verificado que o mesmo tem potencial antiviral (SIDDIQUI, 1996), antimicrobiano (STECCHINI et al., 1993) e antifúngico (KARAPINAR, 1990).

Segundo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (2013), o eugenol e o óleo de cravo da Índia são recomendáveis para eutanásia nas classes Osteichthyes (peixes ósseos) e Chondrichthyes (peixes cartilagosos), ou seja, causam pouco ou nenhum sofrimento e causam a morte de forma humanitária quando usados de forma isolada.

### 3.3. ESTRESSE EM PEIXES

O cultivo de peixes, assim como qualquer outra atividade agrícola, preza pela alta lucratividade. No entanto, alguns requisitos são necessários para que se alcance a lucratividade desejada, entre eles, organização e administração eficiente do piscicultor, assim como o conhecimento adequado da biologia e da fisiologia da espécie cultivada. Os peixes, quando submetidos a situações diferentes das encontradas em seu ambiente natural, tendem a apresentar respostas fisiológicas prejudiciais ao seu desenvolvimento.

O ambiente aquático é caracterizado por mudanças abruptas em sua composição físico-química. Logo, por ser altamente dinâmico, sua composição com relação ao pH, oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade e compostos nitrogenados, pode variar muito rapidamente, transformando o local outrora adequado para determinada espécie em um ambiente adverso e estressante (JORGENSEN, et al., 2002; COSTA et al., 2004;).

O estresse pode ser basicamente definido como um estímulo que promove alterações ou quebra da homeostase. Selye (1973) considerou o estresse como uma série de respostas, denominadas como Síndrome Geral de Adaptação, a qual apresenta três estágios: (1) reação de alarme: uma série de alterações fisiológicas, como resposta inicial ao estímulo estressor, que ocorre de forma a compensar o distúrbio; (2) resistência: respostas fisiológicas de ajuste ou compensatórias para retorno à homeostase; (3) exaustão: a duração ou severidade dos distúrbios causados pela exposição ao estressor excede os limites, podendo levar a uma condição patológica ou morte.

Quando os peixes são submetidos à situação de estresse, ocorre a ativação de dois eixos neuroendócrinos. O primeiro é o Hipotálamo-Sistema Nervoso Simpático-Células Cromafins, que resulta na liberação das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). O segundo é o eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal, que culmina na liberação dos corticosteroides (cortisol e cortisona). Assim, a ação desses hormônios em diversos órgãos-alvos resulta em modificações bioquímicas e fisiológicas (PERRY & LAURENT, 1993; WENDELAAR BONGA, 1997; CASTRO & FERNANDES, 2009).

De uma forma geral, a resposta ao estresse apresenta três níveis: as respostas primárias, as secundárias e as terciárias. As respostas primárias são responsáveis pela ativação dos centros cerebrais que resultam na liberação de catecolaminas e de corticosteroides. As respostas secundárias desencadeiam alterações bioquímicas e fisiológicas como aumentos do débito cardíaco, da capacidade de transporte de O<sub>2</sub>, da mobilização de substratos energéticos e dos distúrbios no balanço hidromineral. Enquanto que as respostas terciárias se estendem para o nível de organismo e populacional, apresentando efeitos como inibição do crescimento, da reprodução, da resposta imune, além da redução da capacidade de tolerância a agentes estressores adicionais (OBA et al., 2009).

A resposta primária ao estresse está relacionada inicialmente a percepção do estímulo estressor pelo sistema nervoso central. Após esta constatação, ocorre liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, que por sua vez estimula a hipófise ou pituitária a liberar o hormônio adrenocorticotrófico ou adrenocorticotrofina (ACTH). O ACTH circula para o interior do rim, onde estimula as células inter-renais, localizadas na região rim-cefálica, ao longo da veia cardinal, e seus ramos para a produção de cortisol e de hormônios corticosteróides (WEDEMEYER, 1996; MOMMSEN et al., 1999). O sistema nervoso simpático, por nervos eferentes, estimula o tecido cromafim no rim cefálico a sintetizar as catecolaminas, noradrenalina e adrenalina (BRAUN, 2010). Estes hormônios, por sua vez, iniciam uma série de mudanças bioquímicas e fisiológicas, conhecida como respostas secundárias ao estresse.

Os efeitos metabólicos das respostas secundárias incluem ativação do sistema cardiovascular, hiperglicemia, hiperlactatemia, depleção das reservas glicogênicas, lipólise e inibição da síntese proteica. Aumento do catabolismo de proteínas musculares e alterações nos níveis plasmáticos de aminoácidos, ácidos graxos livres e colesterol também podem ocorrer (PICKERING & POTTINGER, 1989; MILLIGAN, 2003; MARTINS DA ROCHA et al., 2004). Além destas respostas, há um aumento da contração esplênica, podendo promover elevação dos valores de hematócrito e aumento do volume dos eritrócitos e número de

eritrócitos circulantes, com consequente elevação da concentração de hemoglobina (SOLDATOV, 1996; MARIANO, 2006).

Logo após esse conjunto de modificações, controlado pelo sistema neuroendócrino na tentativa de recuperação da homeostase, é conduzida a chamada resposta terciária ao estresse. Esse estágio é caracterizado pela quebra total da homeostase e consequente redução do crescimento, sucesso reprodutivo, resistência do organismo frente a infecções, doenças e sobrevivência (JOBILING, 1994; PANKHUST & VAN DER KRAAK, 1997).

### 3.4. PANORAMA DA PISCICULTURA ORNAMENTAL

Os países asiáticos são os maiores produtores e exportadores de peixes ornamentais do mundo. A produção aquícola ornamental de países como Malásia, Indonésia, Filipinas e Sri Lanka é baseada em espécies nativas da região, como o beta *Betta splendens*, beijador *Helostoma temminckii* e o barbus tigre *Puntius tetrazona*. Assim como também desenvolvem pacotes tecnológicos de produção de diversas espécies exóticas de alto valor comercial, como o acará disco *Symphysodon aequifasciatus*, nativo da região Amazônica (RIBEIRO, 2008).

O Brasil é reconhecido internacionalmente como grande exportador de peixes ornamentais. Isso devido aos milhões de peixes que são coletados na Bacia Amazônica, em especial na região de Barcelos-AM, onde uma fatia representativa da economia do município é atribuída à pesca de peixes ornamentais (CHAO et al., 2001). No entanto, apesar do comércio de peixes ornamentais coletados no ambiente natural ser predominantemente para exportação, também há a produção das principais espécies nativas e exóticas em cativeiro, que atendem basicamente o mercado interno.

Atualmente, o maior polo produtor brasileiro de peixe ornamental localiza-se no Estado de Minas Gerais, na região da Zona da Mata Mineira, sendo Patrocínio de Muriaé um dos municípios mais relevantes nesta atividade (CARDOSO, 2012). Um estudo realizado pela AAQUIPAM (Associação de Aquicultores de Patrocínio de Muriaé), em 2006 (não publicado), estimou a existência de mais de 350 produtores na região, prevalecendo pequenos criatórios, com média de 2 a 3 hectares cada (CARDOSO & IGARASHI, 2009).

No entanto, a criação de espécies nativas é limitada, seja pela falta de pacotes tecnológicos relacionados à reprodução, larvicultura e nutrição; pela falta de pesquisadores e pesquisas voltadas para a área; pelo impedimento devido à proibição de órgãos ambientais; e até mesmo pelo desconhecimento das inúmeras espécies com potencial para aquariofilia, principalmente as amazônicas.

### 3.5. O ACARÁ SEVERO

Dentre as espécies amazônicas com potencial para a aquariofilia, destaca-se o acará severo. Segundo a descrição da espécie feita por Heckel em 1840, a espécie pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Cichlidae, gênero *Heros* e espécie *Heros severus*. Indivíduos dessa espécie são encontrados em toda a Amazônia (Brasil), na Guiana, na Bacia do Orinoco da Venezuela, e na bacia do Tocantins no Brasil (KULLANDER, 1986).

Os exemplares dessa espécie são fortemente comprimidos lateralmente, com um corpo estreito e região ventral comprimida quando visto de frente. Os olhos são relativamente grandes na lateral da cabeça. Os juvenis apresentam oito bandas negras verticais claramente definidas. Quando adultos, após atingirem a maturidade sexual, ocorre uma variação na intensidade da cor. Os machos são mais coloridos, com nadadeiras em tons de vermelho e laranja, assim como a presença de coloração vermelho em mosaico pelo seu corpo. A fêmea é geralmente menor e menos colorida, com um tom de verde oliva predominante.

Em comparação com os outros membros do gênero *Heros*, o *H.severus*, tem uma boca, pequena, lábios estreitos, rosto pontudo e uma ampla faixa azul-cinza no maxilar inferior. Em adultos, na maioria das vezes, somente a sétima faixa vertical ainda é vigorosamente visível todo o tempo. A cor preta desta banda estende-se da dorsal, mas não chega até a nadadeira anal. Além disso, esta mesma faixa vertical pode ser mais visível ou desaparecer dependendo do comportamento do peixe.

Na natureza, o acará severo é habitante de águas lentas, comumente encontrado em igarapés e lagos, tanto de águas claras como escuras. São onívoros, mas com uma ênfase significativa em material vegetal (LOWE-MCCONNELL, 1969). De acordo com Knoppel (1970), que analisou o conteúdo do estômago em nove espécimes do gênero *Heros*, incluindo *H. severus*, frutas compunham 47% do volume total, "detritos" (matéria vegetal irreconhecível) 23%, peixes 8% e crustáceos 7%.

No entanto, mesmo com evidente apelo desta espécie para a aquariofilia, é notória a falta de informações na literatura. Assim, para suprir esta carência de informações, faz-se necessário o desenvolvimento de um pacote tecnológico na área da reprodução, larvicultura, nutrição e manejo da espécie.

## REFERÊNCIAS

- BITTENCOURT, F.; SOUZA B. E.; NEU, D. H.; RORATO, R. R.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Eugenol e benzocaína como anestésicos para juvenis de *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (carpa comum). *Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.8, p. 163-167, 2013.
- BRAUN, N. Crescimento e respostas bioquímicas do dourado (*Salminus Brasiliensis*) em diferentes densidades de estocagem e manuseios. Tese (Doutorado em Aquicultura) – **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 105p, 2010.
- CARDOSO, R. S.; IGARASHI, M. A. Aspectos do agronegócio da produção de peixes ornamentais no Brasil e no Mundo. **Pubvet**, v. 14, p. 40-42, 2009.
- CARDOSO, R. S.; LANA, A. M. Q.; TEIXEIRA, E. A.; LUZ, R. K. ; FARIA, P. M. C. Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da zona da mata mineira. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, p. 89-96, 2012.
- CASTRO, F. J.; FERNANDES, M. N. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: Tavares-Dias, M. (Org). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 361-388, 2009.
- CHAO, N. L.; PETRY, P.; PRANG, G. Project Piaba – Maintenance and sustainable development of ornamental fisheries in the Rio Negro basin, Amazonas, Brazil. In: *Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonian, Brazil- Project Piaba* (ed. by Chao NL, Petry P, Prang G, Sonneschien L, Tlusty M). **Universidade do Amazonas**, Manaus, 2001.
- COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, p. 627- 636, 2004.
- DELBON, M. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Eugenol em juvenis de tilápias no Nilo: concentrações e administrações sucessivas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, p. 43-52, 2012.
- DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA, 2013. Disponível em:<[http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0226/226746.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226746.pdf)>
- GOMULKA, P.; WLASOW, T.; VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; CHMIELINSKA, E. Effects of eugenol and MS-222 anaesthesia on siberian sturgeon *Acipenser baerii* brandt. **Acta Veterinaria Brno**, v. 77, p. 447–453, 2008.
- GOMULKA, P.; DAĞOWSKI, J.; WŁASOW, T.; SZCZEPKOWSKI, M.; CZERNIAK, E.; ZIOMEK, E.; SZCZARBOWSKI, A.; ŁUCZYŃSKI, M.; SZKUDLAREK, M. Haematological and Biochemical Blood Profile in Russian Sturgeon Following Propofol and Eugenol Anaesthesia. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v.15, p. 13-17, 2015.

IBAMA. Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquarofilia. **IBAMA**, p. 214, 2008.

INOUE, L. A. K. A.; SANTOS NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, p. 943-947, 2003.

INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L.; RIBEIRO, P. T.; SILVA, A. M. D.; AFFONSO, E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, v.41, p. 327–332, 2011.

JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU, A. H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish: review. **Fish Physiology Biochemistry**, v.38, p. 1545-52, 2012.

JOBLING, M. Fish Bioenergetics. London: **Chapman & Hall**, 1994.

JORGENSEM, E. H.; VIJAYAN, M. M.; ALURU, N.; MAULE, A. G. Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose, and lactate responses to a handling disturbance in Arctic charr. **Comparative Biochemistry and Physiology**, V. 132, p. 235-245, 2002.

KARAPINAR, M. Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p.193–200, 1990.

KNOPPEL, H. A. Food of Central Amazonian fishes. **Amazoniana**, v. 2, p. 257-352, 1970.

KULLANDER, S. O. Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History, **Stockholm**, 431 p., 1986.

LOWE-MCCONNELL. The cichlid fishes of Guyana, South America, with notes on their ecology and breeding behavior. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 48, p. 255-302, 1969.

MARIANO, W. S. Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju, *Hopleryrhinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 77p., 2006.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. Are better anaesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v. 10, p. 2-5, 1985.

MARTINS DA ROCHA, R.; CARVALHO, E. G.; URBINATI, E. C. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 245-249, 2004.

MC FARLAND, W. N. A. Study of the effects of anaesthetics on the behavior and physiology of fishes. **Publications of the Institute Marine Science**, v. 6, p. 22-55, 1959.

- MILLIGAN, C. L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal Of Experimental Biology** v. 206, p. 3167-3173, 2003.
- MITJANA, O.; BONASTRE, C.; INSUA, D.; FALCETO, M. V.; ESTEBAN, J.; JOSA, A. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**, v.433, p. 491-495, 2014.
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.
- NOCHETTO, C. B.; REIMSCHUESSEL, R.; GIESEKER, C.; CHEELY, C. S.; CARSON, M.C. Determination of tricaine residues in fish by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 1241-1248, 2009.
- OBA, E. T.; MARIANO, W. DOS S.; SANTOS, L. R. B. DOS. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 226-247, 2009.
- PANKHURST, N. W.; VAN DER KRAAK, G. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: Iwama, G. K.; Pickering, A. D.; Sumpter, J. P.; Schreck, C. B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. United Kingdom: Cambridge University Press, p. 73-93, 1997.
- PARK, M. O.; HU, W. J.; IM, S. Y.; SEUL, D. W.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2008.
- PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. **Fish Ecophysiology**. London: Chapman & Hall, p. 231-264, 1993.
- PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 7, p. 253-258, 1989.
- RIBEIRO, F. A. S. R. Panorama mundial do mercado de peixes ornamentais. **Panorama da Aquicultura**, Brasil, v. 108, p. 32 – 37, 2008.
- ROCHA, A. F.; STECH, M. R.; PINHEIRO, M. F. M.; PAGANI, D. M.; SUKEKAVA, C. F. Use of eugenol as an anaesthetic for *Geophagus Brasiliensis* juveniles. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.41, p. 795–802, 2015.
- ROSS, L. G.; ROSS, B.. Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals. Oxford: **Blackwell Science**, 240 p, 2008
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 66, p. 37-40, 2001.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L.; VAL, A. L. Eugenol as na. efficacious anaesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.36, p.1056-1061, 2005.

SELYE, H. The evolution of the stress concept. **American Scientist**, v. 61, p. 692-699, 1973.

SIDDIQUI, Y. M. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type I and Newcastle disease virus. **Medical Science Research**, v. 24, p. 185-186, 1996.

SILVA-SOUZA, J. G.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; FARIAS, W. M.; VALÉRIO JÚNIOR, J. F.; MENDONÇA, P. P. Eugenol como anestésico para oscar, *Astronotus ocellatus*. **Archivos de zootecnia**, v.64, p. 205-210. 2015.

SIMÕES, L. N.; GOMIDE, A. T. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; GOMES, L. C. O. Uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, v.34, p. 175-181, 2012.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.21, p. 32-43, 2012.

SOLDATOV, A. A. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study. **Journal of Fish Biology**, v. 48, p. 321-328, 1996.

STECCHINI, M. L.; SARAIS, I.; GIAVEDONI, P. Effects of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 406–409, 1993.

VELISEK, J.; STARA, A.; LI, Z.; SILOVSKA, S.; TUREK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 310, p. 369-375, 2011.

WEDEMEYER, G. A. Physiology of fish in intensive culture systems. New York: **Chapman & Hall**, 1996.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. V.77, p. 591–625, 1997.

## **CAPÍTULO II**

### **EUGENOL COMO ANESTÉSICO NO MANEJO DO PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO ACARÁ SEVERO *Heros severus***

Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira  
ISSN 1678-3921

**Eugenol como anestésico no manejo do peixe ornamental amazônico acará severo *Heros  
severus* (Heckel, 1840)**

Bruno César Brito Dias<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia de Pesca, Alameda Leandro Ribeiro, s/nº, CEP 68600-000 Bragança, PA, Brasil. E-mail: [brunorazec@gmail.com](mailto:brunorazec@gmail.com),

Resumo - Com o presente trabalho objetivou-se avaliar a eficiência do eugenol como anestésico para duas classes de tamanho do acará severo, *Heros severus* e verificar qual a dose mais eficiente no tempo de indução e recuperação à anestesia. Foram utilizados 120 indivíduos de *H. severus*, alevinos (n=60) com  $0,07 \pm 0,01$  g e  $1,3 \pm 0,29$  cm e adultos (n=60) com  $25,2 \pm 0,86$  g e  $8,2 \pm 0,12$  cm. Os alevinos foram transferidos aleatoriamente para seis aquários de 60L em uma densidade de estocagem de 10 exemplares por aquário. Da mesma forma, os adultos, para seis aquários de 200L, com densidade de estocagem de 10 exemplares por aquário. Realizou-se os experimentos em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (50; 75; 100; 125; 150 e  $175 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 10 repetições, sendo o peixe a unidade experimental. Todas as concentrações de eugenol testadas foram eficientes em induzir alevinos e adultos ao estágio de anestesia profunda. Recomenda-se para os alevinos a concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , para realização de manejos de curta e de longa duração. Para os adultos, recomenda-se a concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  para procedimentos de curta duração e  $75 \text{ mg L}^{-1}$  para procedimentos de longa duração.

Termos para indexação: ciclídeo amazônico, anestesia leve, anestesia profunda, óleo de cravo, piscicultura.

**Eugenol as an anesthetic in the management of ornamental fish Amazonian banded  
cichlid *Heros severus* (Heckel, 1840)**

Abstract -. With this study aimed to evaluate the eugenol efficiency as anesthetic for two size classes of ornamental fish banded cichlid, *Heros severus* and find what the most effective dose in the induction time and anesthesia recovery. Were used 120 individuals of *H. severus*, fingerlings (n=60) with  $0.07 \pm 0.01$ g and  $1.3 \pm 0.29$  cm and adults (n=60) with  $25.2 \pm 0.86$  g and  $8.2 \pm 0.12$  cm. The fingerlings were transferred randomly to six aquariums 60L in a 10 copies per aquarium stocking density. Similarly, adults 200L to six aquaria, with 10 copies per tank stocking density. We conducted the experiments in a completely randomized design with six treatments (50; 75; 100; 125; 150 and 175 mg L<sup>-1</sup>) and 10 repetitions, and the fish the experimental unit. All eugenol concentrations tested were effective in inducing fingerlings and adults banded cichlid to profound anesthesia stage. Recommended for fingerlings the concentrations of 50 mg L<sup>-1</sup> to short duration procedures and 75 mg L<sup>-1</sup> to long duration procedures.

Index terms: cichlid amazon, light anesthesia, deep anesthesia, clove oil, pisciculture.

### **Introdução**

No ramo da aquariofilia, o Brasil possui importância como grande exportador de peixes ornamentais, devido aos milhões de peixes que são coletados na Bacia Amazônica, em especial na região de Barcelos-AM, onde uma fatia representativa da economia do município é atribuída à pesca de peixes ornamentais (Chao et al., 2001). Com relação à produção em cativeiro, atualmente, o maior polo produtor brasileiro de peixe ornamental localiza-se no estado de Minas Gerais, na região da Zona da Mata Mineira, sendo Patrocínio de Muriaé um dos municípios mais relevantes nesta atividade (Cardoso, 2012). Um estudo realizado pela Associação de Aquicultores de Patrocínio de Muriaé (AAQUIPAM) em 2006 estimou a

existência de mais de 350 produtores na região, prevalecendo pequenos criatórios, com média de 2 a 3 hectares cada (Cardoso & Igarashi, 2009).

O país, apesar de ser reconhecido como exportador de peixes ornamentais, possui poucas publicações científicas sobre o assunto, sendo a maioria relacionada a peixes marinhos (Ibama, 2008). A ausência de produção técnica e científica sobre o assunto reflete em deficiências, como a falta de protocolos de manejo, reprodução, nutrição e bem estar desses indivíduos, demonstrando uma subutilização do potencial de uma gama de espécies com potencial para aquarofilia.

Dentre as espécies amazônicas com potencial para piscicultura ornamental, destaca-se o acará severo. Segundo a descrição da espécie feita por Heckel em 1840, a espécie pertence ao reino Animália, filo Chordata, classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Cichlidae, gênero *Heros* e espécie *Heros severus*. A espécie é encontrada em toda a Amazônia (Brasil), na Guiana, na Bacia do Orinoco da Venezuela, e na bacia do Tocantins no leste do Brasil (Kullander, 1986). Os indivíduos dessa espécie são fortemente comprimidos lateralmente, com um corpo estreito e peito achatado, quando vistos de frente. Os olhos são relativamente grandes na lateral da cabeça. Os juvenis apresentam oito bandas negras verticais claramente definidas ao longo do corpo. Quando adultos, após atingirem a maturidade sexual, ocorre uma variação na intensidade da cor. Os machos são mais coloridos, com nadadeiras em tons de vermelho e laranja, assim como a presença de coloração vermelho em mosaico pelo seu corpo. A fêmea, por sua vez, é geralmente menor e menos colorida, com um tom de verde oliva claro predominante. No período reprodutivo as fêmeas apresentam uma alteração na sua coloração, com escurecimento da região dorsal e lateral, ficando esta região com uma coloração verde oliva escura, assim como a região ventral, que por sua vez apresenta uma intensificação na coloração amarela.

Em pisciculturas e centros de pesquisas, existem inúmeros procedimentos de manejo realizados com os peixes: biometrias, transporte, repicagem e coletas de sangue (Mylonas et al., 2005). Devido a isso, a utilização de anestésicos tem se tornado uma ferramenta cada vez mais comum na piscicultura ornamental, por possibilitar com mais tranquilidade a realização dessas operações.

Atualmente, muitos produtos químicos são utilizados como anestésicos para peixes. Entre eles, os mais comuns são a tricafina metanosulfato (MS-222), a quinaldina e o eugenol (Velisek et al., 2011). O eugenol (metoxifenol 4-alil-2), que tem seu princípio ativo encontrado no óleo de cravo, destaca-se dentre os demais por ser um produto natural, derivado do caule, folhas e flores da árvore *Eugenia caryophyllata*, podendo compreender de 70 a 90% em peso do óleo de cravo. Entre as várias vantagens do uso do eugenol, destaca-se o fato do composto ser facilmente adquirido no mercado, apresentar baixo custo, além de ser seguro para o meio ambiente e o manipulador (Roubach et al., 2005). Assim, por conta de sua comprovada eficiência e suas vantagens operacionais, diversos estudos vêm sendo realizados utilizando o eugenol como anestésico para peixes de corte. No entanto, ainda são escassos na literatura estudos deste anestésico com espécies ornamentais.

Desta forma, com o presente trabalho, buscou-se analisar a eficiência do eugenol como anestésico para duas classes de tamanho do peixe ornamental amazônico acará severo *H. severus* e verificar qual a dose mais eficiente no tempo de indução e recuperação à anestesia.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais da Faculdade de Engenharia de Pesca do Instituto de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará, *Campus* de Bragança.

Os exemplares do peixe ornamental acará severo, *H. severus*, utilizados no presente trabalho são provenientes da Piscicultura São Tomé, localizada no município de Terra Alta – PA, latitude 01°02'28" sul e longitude 47°54'27" oeste. Estes foram transportados em sacos plásticos até o laboratório e acondicionados em caixas plásticas de 200L, para a adaptação as condições laboratoriais até o início do experimento.

Foram utilizados 120 indivíduos de *H. severus*, divididos em duas classes de tamanho: alevinos (n=60) com  $0,07 \pm 0,01\text{g}$  e  $1,3 \pm 0,29\text{cm}$  e adultos (n=60) com  $25,2 \pm 0,86\text{g}$  e  $8,2 \pm 0,12\text{cm}$ . Os alevinos foram selecionados em tamanhos homogêneos e transferidos aleatoriamente para seis aquários de 60 L em uma densidade de estocagem de 10 exemplares por aquário. Da mesma forma, os adultos, foram selecionados aleatoriamente e transferidos em tamanhos homogêneos para seis aquários de 200L, também em densidade de estocagem de 10 exemplares por aquário. Após novo período de aclimatação, realizou-se os experimentos em um delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos, ou seja, concentrações de eugenol (50; 75; 100; 125; 150 e  $175 \text{mgL}^{-1}$ ) e 10 repetições, sendo o peixe a unidade experimental.

Para o preparo da solução padrão, o eugenol foi previamente diluído em álcool etílico absoluto (99,5°GL) na concentração de 1:10. O experimento foi realizado não tendo conhecimento o avaliador de qual concentração era testada. Em ambas as classes de tamanho (alevinos e adultos) foram utilizados dois aquários com aeração constante, tanto para os processos de anestesia e recuperação anestésica. Para os alevinos foram utilizados dois aquários de 2L. O primeiro, onde ocorria a indução, continha 1L de água acrescida a solução anestésica na respectiva concentração testada. O segundo, onde ocorria a recuperação, continha 2L de água sem anestésico. Da mesma forma, procedeu-se com os adultos, entretanto utilizando aquários de 20L. O primeiro contendo 5L de água mais a solução anestésica para a indução e o segundo 10L de água para a recuperação.

Os sinais peculiares da indução a anestesia profunda e recuperação dos animais foram observados de acordo com metodologia adaptada de Mitjana et al., (2014) e registrados por cronômetro digital (Tabela 1). O tempo gasto até o animal atingir os estágios de anestesia leve, anestesia profunda e de recuperação foi monitorado com cronômetro digital e registrado para realização de futuras análises dos dados. Além disso, 96 horas após a indução à anestesia, averiguou-se a sobrevivência dos peixes nas diferentes concentrações testadas.

Tabela 1 - Tempos de anestesia e recuperação anestésicas utilizados no presente trabalho. Modificado de Mitjana et al., (2014).

<b>ESTÁGIO DE ANESTESIA</b>	<b>DESCRIÇÃO E COMPORTAMENTO</b>
Anestesia leve	Perda total de equilíbrio, nadadeiras peitorais com movimentação regular, batimento opercular normal.
Anestesia profunda	Nenhum movimento, perda de resposta para estímulos táteis, batimento opercular lento e irregular.
Recuperação	Resposta frente estímulos táteis e visuais, natação normal.

Após anestesia de cada peixe, a água do aquário contendo eugenol foi trocada para evitar diminuição da concentração do anestésico de uma repetição para outra. Da mesma forma, para evitar o acúmulo de resíduos do anestésico e dos metabólitos eliminados pelos peixes na água do aquário de recuperação, esta também foi renovada a cada exemplar recuperado da anestesia.

Para a realização do experimento, todas as variáveis de qualidade de água dos aquários de anestesia e recuperação foram mantidas próximas às condições pré-experimentais. Durante a realização do experimento, as variáveis como, temperatura ( $27,20 \pm 0,08$  °C), oxigênio dissolvido ( $6,26 \pm 0,28$  mg L<sup>-1</sup>), pH ( $5,65 \pm 0,47$ ) e condutividade ( $0,70 \pm 0,05$  µs) foram mensuradas por meio da sonda multiparâmetro Horiba (U-10).

Para análise estatística, utilizou-se o programa SISVAR 4.3. Os dados foram submetidos a uma análise de variância ANOVA e, em caso de significância ( $P < 0,05$ ), foram submetidos a um teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### Resultados

Em todas as concentrações, observou-se 100% de sobrevivência em até 72 horas após o procedimento de indução e recuperação dos peixes à anestesia. Os valores dos tempos de indução, recuperação anestésica e o desvio padrão dos mesmos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Tempo médio em segundos  $\pm$  (DP) dos estágios de anestesia leve, anestesia profunda e recuperação de alevinos e adultos de *Heros severus*, submetidos à anestesia com eugenol.

ESTÁGIO DE ANESTESIA	ALEVINOS					
	50 mg L <sup>-1</sup>	75 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	125 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	175 mg L <sup>-1</sup>
Anestesia leve	50,6 $\pm$ 11,7 a	37,6 $\pm$ 7,5 b	28,3 $\pm$ 6,2 c	29,5 $\pm$ 4,8 c	24,7 $\pm$ 7,4 c	24,6 $\pm$ 3,2 c
Anestesia Profunda	143,5 $\pm$ 16,3 a	133,6 $\pm$ 15,5 a	107,6 $\pm$ 15,9 b	95,3 $\pm$ 9,8 b	96,8 $\pm$ 14,8 b	80,1 $\pm$ 15,1 c
Recuperação	277 $\pm$ 47,7 d	464,1 $\pm$ 109 c	555,9 $\pm$ 61,9 b	754 $\pm$ 65,3 a	793 $\pm$ 82,7 a	781,1 $\pm$ 54 a
ESTÁGIO DE ANESTESIA	ADULTOS					
	50 mg L <sup>-1</sup>	75 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	125 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	175 mg L <sup>-1</sup>
Anestesia leve	77 $\pm$ 11,5 a	52,6 $\pm$ 10,1 b	56,4 $\pm$ 6,2 b	51,5 $\pm$ 11,5 b	53 $\pm$ 11,5 b	46,9 $\pm$ 8,6 b
Anestesia Profunda	359 $\pm$ 90,4 a	169,8 $\pm$ 39,9 b	143 $\pm$ 24,5 b	133,2 $\pm$ 22,5 b	109,3 $\pm$ 26,5 c	82,2 $\pm$ 16,1 c
Recuperação	385,2 $\pm$ 74,7 a	288,2 $\pm$ 63,6 b	276,8 $\pm$ 57,9 b	309,6 $\pm$ 16,6 b	282,7 $\pm$ 37,8 b	342,5 $\pm$ 74,3 a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

As concentrações de eugenol influenciaram significativamente ( $P < 0,05$ ) no tempo de indução dos alevinos e adultos de *H. severus* ao estágio de anestesia leve. Para os alevinos, o tempo de indução à anestesia leve das concentrações 50 e 75 mg L<sup>-1</sup> diferiram estatisticamente entre si, apresentando os peixes expostos a menor concentração um maior tempo de indução. Por outro lado, os alevinos submetidos nas concentrações de 100, 125, 150 e 175 mg L<sup>-1</sup> não diferiram estatisticamente entre si, apresentando um tempo de indução a anestesia leve menor do que as concentrações de 50 e 75 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1). Para os adultos, o tempo de indução a

anestesia leve dos peixes submetidos à concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> foi superior ao dos peixes submetidos às concentrações de 75, 100, 125, 150 e 175 mg L<sup>-1</sup>, que não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1).

Houve efeito significativo ( $P < 0,05$ ) das concentrações de eugenol sobre o tempo de indução dos alevinos e adultos de *H. severus* ao estágio de anestesia profunda. Para os alevinos, os tempos de indução ao estágio de anestesia profunda nas concentrações de 50 e 75 mg L<sup>-1</sup> não apresentaram diferenças estatísticas entre si. No entanto, ambas diferenciaram-se das demais concentrações testadas, sendo a de 175 mg L<sup>-1</sup> a que apresentou menor tempo de indução (Tabela 1). O tempo de indução a anestesia profunda dos adultos submetidos na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> foi superior aos expostos nas de 75, 100 e 125 mg L<sup>-1</sup>, que foram estatisticamente iguais. As concentrações anestésicas de 150 e 175 mg L<sup>-1</sup> apresentaram os menores tempos de indução a anestesia profunda, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 1).

As concentrações de eugenol influenciaram significativamente ( $P < 0,05$ ) o tempo de recuperação dos alevinos e adultos de *H. severus* aos estágios submetidos à anestesia profunda. Para os alevinos, a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> apresentou o menor tempo de recuperação, enquanto que os expostos as concentrações de 125, 150 e 175 mg L<sup>-1</sup>, não diferiram estatisticamente entre si, apresentando os maiores tempos (Tabela 1). Os tempos de recuperação dos adultos submetidos à concentração 50 e 175 mg L<sup>-1</sup>, menor e maior concentrações testadas respectivamente, não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, ambas as concentrações apresentaram tempos de recuperação estatisticamente superiores as concentrações de 75, 100, 125 e 150 mg L<sup>-1</sup>, que são estatisticamente iguais (Tabela 1).

## Discussão

Um aspecto muito importante na utilização de um agente anestésico é a sua segurança em relação ao ambiente, ao manipulador e ao peixe. É preciso que o agente anestésie o animal, mas não ofereça risco à sobrevivência no pós-anestesia. Em trabalho com eugenol, onde se testou o produto como anestésico para os ciclídeos acará bandeira *Pterophyllum scalare* (Mitjana et al., 2014), oscar *Astronotus ocellatus* (Silva-Souza et al., 2015), acará *Geophagus brasiliensis* (Rocha et al., 2015) e tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Delbon et al., 2012; Simões et al., 2012), foi observado 100 % de sobrevivência no período pós-tratamento, corroborando com demonstrado no presente estudo com alevinos e adultos de acará severo.

Nos experimentos realizados, pôde-se observar a passagem sequencial dos estágios de anestesia leve para a profunda, seguido pela recuperação anestésica. Isto demonstra a eficiência do uso do eugenol como anestésico para alevinos e adultos de *H. severus*. O mesmo anestésico teve sua eficiência comprovada quando utilizado com os ciclídeos amazônicos, acará bandeira *P. scalare* (Mitjana et al., 2014), oscar *A. ocellatus* (Silva-Souza et al., 2015) e o acará *G. brasiliensis* (Rocha et al., 2015). Além de ter a sua eficiência comprovada e utilização com segurança para uma gama de espécies de peixes como o tambaqui *Colossoma macropomun* (Inoue et al., 2011), tilápia do Nilo (Simões et al., 2012; Ribeiro et al., 2015), matrinxã *Brycon cephalus* (Inoue et al., 2003), Piraputanga *Brycon hilarii* (Fabiani et al., 2013), ariacó *Lutjanus synagris* (Souza et al., 2015), e peixes ornamentais, como o quinguio *Carassius auratus* (Bittencourt et al., 2012) e guppy *Poecilia reticulata* (Cunha et al., 2015).

No decorrer da indução à anestesia com eugenol, o padrão comportamental exibido pela espécie do presente estudo, em ambas as fases, foi similar ao descrito por Ross e Ross, (2008), apresentando sinais de hiperatividade ao contato inicial com o anestésico, natação agitada, movimentos operculares acelerados, seguido de relaxamento muscular, pequenos

espasmos musculares, diminuição dos batimentos operculares e perda parcial e total do equilíbrio. Comportamentos eufóricos com movimentação acelerada foram observados em tilápia do Nilo anestesiadas com eugenol nas concentrações de 40 e 60 mg L<sup>-1</sup> (Vidal et al., 2008), juvenis do oscar nas concentrações de 80 e 100 mg L<sup>-1</sup> (Silva-Souza et al., 2015), assim como em juvenis de *G. brasiliensis*, nas concentrações de 100 e 175 mg L<sup>-1</sup>, (Rocha et al., 2015).

No presente trabalho, observou-se que para alevinos e adultos o aumento da concentração do anestésico promoveu a diminuição do tempo de indução a anestesia leve. Para os adultos, a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> mostrou-se eficiente, induzindo os peixes no tempo médio de 77 segundos, dentro do tempo limite (180 segundos) preconizado por Keene et al (1998) e próximo aos valores encontrados em experimentos com os ciclídeos amazônicos acará bandeira (Mitjana et al., 2014), oscar (Silva-Souza et al., 2015) e o *G. brasiliensis* (Rocha et al., 2015).

A concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup> de eugenol foi eficiente em induzir anestesia leve em tempo consideravelmente satisfatório, tanto em alevinos, como adultos de *H. severus*. Da mesma forma que observado em outras espécies de clima tropical como o tambaqui (Inoue et al., 2011), pacu *Piaractus mesopotamicus* (Rotili et al., 2012), pacamã *Lophiosilurus alexandri* (Ribeiro et al., 2013), tilápia do Nilo (Simões et al., 2012; Ribeiro et al., 2015), matrinxã (Inoue et al., 2003), ariacó (Souza et al., 2015), *G. brasiliensis* (Rocha et al., 2015) e lambari *Astyanax altiparanae* (Pereira Da Silva et al., 2009).

Comparando os tempos de indução entre as duas classes de tamanho, nota-se que os alevinos chegam mais rapidamente que os adultos ao estágio de anestesia profunda em todas as concentrações do anestésico utilizada. De acordo com Zahl et al. (2009), o peso de corpo é um fator importante, que afeta a eficácia dos agentes anestésicos relativo aos tempos de indução e recuperação à anestesia. Trabalhos com anestésicos utilizando peixes de massa

corpórea tão pequena ( $0,07 \pm 0,01\text{g}$ ), como os utilizados no presente estudo, são escassos na literatura. Variáveis como o peso, comprimento, formato do corpo, idade, sexo, estágio de maturação sexual e superfície das brânquias, interferem no tempo de indução e na eficiência dos anestésicos (Woody et al., 2002; Roos & Roos, 2008; Carter et al., 2011; Hoseini et al., 2013). Neste contexto, as brânquias recebem atenção especial, pois é por ela que as substâncias anestésicas são absorvidas e chegam até a corrente sanguínea (Summerfelt & Smith, 1990). Ao se comparar a área das brânquias ou superfície branquial de espécies de grande porte e de tamanho reduzido, constata-se que as espécimes menores possuem superfície branquial superior (Javaheery et al., 2012). Dessa forma a passagem ou absorção do anestésico é mais eficiente e mais rápida em espécimes de pequeno porte ou em fases iniciais de desenvolvimento, como observado no presente trabalho.

Ao se comparar resultados dos tempos de indução à anestesia em trabalho com alevinos de tilápia do Nilo com  $0,08 \pm 0,002\text{ g}$  (Ribeiro et al., 2015), utilizando as mesmas concentrações de eugenol do presente estudo, percebe-se que o tempo de indução à anestesia profunda dos alevinos de tilápia em todas as concentrações testadas é inferior ao demonstrado no presente trabalho para os alevinos de *H. severus*. Essa diferença entre os tempos de indução, mesmo entre espécies pertencentes a mesma família e possuindo peso corporal muito parecido, sugere uma maior resistência de alevinos de *H. severus* à anestesia com eugenol. Além disso, é preciso levar em consideração que os mecanismos de anestesia em peixes não estão completamente elucidados (Summerfelt & Smith, 1990; Ross & Ross, 2008). Logo, por serem espécies distintas, ambas podem apresentar mecanismos biológicos e respostas fisiológicas diferentes frente ao mesmo agente anestésico.

Keene et al., (1998) sugeriram que um anestésico deve ser eficaz em baixas concentrações e apresentar toxicidade em doses muito superiores as efetivas, além de apresentar rápido tempo de indução (aproximadamente 180 s) e rápida recuperação dos peixes

(aproximadamente 300 s). Com exceção da concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> na indução dos adultos de *H. severus*, todas as concentrações testadas foram suficientes para induzir os peixes ao estágio de anestesia profunda em tempo inferior a 180 segundos. Desta forma, ao se levar em consideração o conceito de dose minimamente eficaz (Marking & Meyer, 1985), pode-se utilizar com segurança a concentração de 75 mg L<sup>-1</sup> como ideal para anestesia em adultos de *H. severus*. Já para o oscar (Silva-Souza et al., 2015) e *G. brasiliensis* (Rocha et al., 2015), o eugenol se mostrou um indutor eficaz à anestesia quando utilizado entre 50 e 80 mg L<sup>-1</sup> de eugenol.

Um dos pré-requisitos para a escolha de um anestésico é a questão econômica (Marking & Meyer, 1985), desta forma, preconiza-se o uso do anestésico em uma concentração minimamente eficiente. Além disso, geralmente as concentrações elevadas de anestésico podem ser estressantes para os peixes, alterando a taxa metabólica, consumo de oxigênio e condições hematológicas (Park et al., 2008).

De uma forma em geral, percebe-se uma relação positiva entre as concentrações de anestésico testadas e o tempo de recuperação dos peixes do estágio de anestesia profunda. Como em experimentos realizados com alevinos de lambari (Pereira Da Silva et al., 2009), pacamã (Ribeiro et al., 2013), tilápia do Nilo (Ribeiro et al., 2015) e *G. brasiliensis* (Rocha et al., 2015), os alevinos de *H. severus* submetidos nas concentrações mais elevadas de eugenol retomaram à condição de equilíbrio e recuperação mais lentamente do que aqueles expostos nas concentrações mais baixas do anestésico. Dessa forma, preconiza-se a utilização de 50 mg L<sup>-1</sup> de eugenol, uma vez que esta foi a única concentração em que os alevinos de acará severo recuperaram o equilíbrio dentro do limite de tempo (300 s) considerado seguro (Keene et al., 1998).

Por outro lado, diferente dos resultados com os alevinos, não foi observado esse padrão de comportamento para o tempo de recuperação de adultos de acará severo induzidos à

anestesia, sendo o tempo de recuperação da concentração mais baixa ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) estatisticamente igual ao da maior concentração ( $175 \text{ mgL}^{-1}$ ). É de amplo conhecimento que o eugenol apresenta efeito acumulativo devido a sua natureza lipofílica, fazendo com que este acumule nos tecidos (Mitjana et al., 2014). Essa característica do fármaco faz com que o mesmo seja metabolizado mais lentamente, o que causa reflexos no tempo de recuperação dos peixes expostos ao eugenol, levando os indivíduos recuperarem-se mais lentamente. Vale ressaltar que a concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , demorou 359 segundos para induzir os adultos ao estágio de anestesia profunda, extrapolando o limite de 180 segundos, considerado seguro por Kenne et al. (1998). Assim, a exposição prolongada ao anestésico somada ao caráter cumulativo do fármaco causaram alterações no tempo de recuperação na dose mais baixa utilizada no presente trabalho. Já as demais concentrações testadas recuperaram os adultos de acará severo dentro da margem de tempo preconizada por Kenne et al., (1998). Desta forma, utilizando o conceito da dose minimamente eficaz, a concentração de  $75 \text{ mg L}^{-1}$ , mostrou-se ideal para indução de adultos de *H. severus*, pois a mesma foi eficaz em induzir e recuperar os peixes dentro da faixa de tempo preconizada pela literatura.

De acordo com os dados apresentados no presente estudo, é possível observar uma larga variação de concentrações de eugenol para anestésiar alevinos e adultos de *H. severus*. No entanto, é perceptível a influência do peso ou mais especificamente da fase de vida nos respectivos tempos de indução e recuperação, reforçando a ideia que cada espécie de peixe em sua respectiva fase de vida tem um tempo específico para indução anestésica conforme suas características fisiológicas.

### **Conclusões**

1 - Recomenda-se para os alevinos de acará severo a concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , para realização de manejos de curta e de longa duração.

2 - Para adultos de acará severo, recomenda-se a concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> para procedimentos de curta duração e 75 mgL<sup>-1</sup> para procedimentos de longa duração.

### Referências

BITTENCOURT, B.E.; SOUZA, W.R.; BOSCOLO, R.R.; RORATO, A. FEIDEN, D.H. NEU. Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.1597-1602, 2012.

CARDOSO, R.S.; LANA, A.M.Q.; TEIXEIRA, E.A.; LUZ, R.K.; FARIA, P.M.C. Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da zona da mata mineira. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, p.89-96, 2012.

CARTER, K.M.; WOODLEY, C.M.; BROWN, R.S. A review of tricaine methanesulfonate for anaesthesia of fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.21, p.51-59, 2011.

CHAO, N.L.; PETRY, P.; PRANG, G. Project Piaba - Maintenance and sustainable development of ornamental fisheries in the Rio Negro basin, Amazonas, Brazil. In: CHAO, N.L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. (Ed.). **Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonian, Brazil – Project Piaba**. Manaus: Editora da Universidade do Amazonas, 2001. p.3-6.

CUNHA, L.; GERALDO, A.M.R.; SILVA, V.C.; CARDOSO, M.S.; TAMAJUSUKU, A.S.K.; HOSHIBA, M.A. 2015. Clove oil as anesthetic for guppy. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.41, p.729–735, 2015.

HOSEINI, S.M.; RAJABIESTERABADI, H.; TARKHANI, R. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. **Aquaculture Research**, v.46, p.1-8, 2013.

IBAMA. **Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquariofilia:** diagnóstico ano de 2007. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2008. 214p. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/recursos\\_pesqueiros/diagnostico\\_completo.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/recursos_pesqueiros/diagnostico_completo.pdf). Acesso em: 07 Fev. 2016.

INOUE, L.A.K.A.; BOIJINK, C.L.; RIBEIRO, P.T.; SILVA, A.M.D.; AFFONSO, E.G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, v.41, p.327–332, 2011.

INOUE, L.A.K.A.; SANTOS NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, v.33, p.943-947, 2003.

JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU, A.H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish: review. **Fish Physiology Biochemistry**, v.38, p.1545-1552, 2012.

KEENE, J.I.; NOAKES, D.I.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO, C.G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89-101, 1998.

KULLANDER, S.O. **Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru**. Stockholm: Swedish Museum of Natural History, 1986. 431p.

MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v.10, p.2-5, 1985.

MITJANA, O.; BONASTRE, C.; INSUA, D.; FALCETO, M.V.; ESTEBAN, J.; JOSA, A. The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Aquaculture**, v.433, p.491-495, 2014.

MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v.246, p.467-481, 2005.

PARK, M.O.; HUR, W.J.; IM, S.Y.; SEOL, D.W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, v.39, p.877-884, 2008.

PEREIRA DA SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F.; RIBEIRO, M. A. R.; COPPOLA, M. P. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v.39, p.1851-1856, 2009.

RIBEIRO, P.A.P.; FILHO, K.C.M.; FILHO, R.M.; SANTOS, A.E.H.; SILVA, W.S.; RODRIGUES, L.A.; LUZ, R.K. Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p.1136-1139, 2013.

RIBEIRO, P.A.P.; MIRANDA-FILHO, K.C.; MELO, D.C.; LUZ, R.K. Efficiency of eugenol as anesthetic for the early life stages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, p.529-535, 2015.

ROCHA, A.F.; STECH, M.R.; PINHEIRO, M.F.M.; PAGANI, D.M.; SUKEKAVA, C.F. Use of eugenol as an anaesthetic for *Geophagus Brasiliensis* juveniles. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.41, p.795–802, 2015.

ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals**. Oxford: Blackwell Science, 2008. 240p.

ROTILI, D.A.; DEVENS, M.A.; DIEMER, O.; LORENZ, E.K.; LAZZARI, R.; BOSCOLO, W.R. Uso de eugenol como anestésico em pacu. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, p. 288-294, 2012.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. Eugenol as efficacious anaesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.36, p. 1056-1061, 2005.

SILVA-SOUZA, J.G.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; FARIAS, W.M.; VALÉRIO JÚNIOR, J.F.; MENDONÇA, P.P. Eugenol como anestésico para oscar, *Astronotus ocellatus*. **Archivos de zootecnia**, v.64, p.205-210, 2015.

SIMÕES, L.N.; GOMIDE, A.T.M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; VAL, A.L.; GOMES, L.C.O. Uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, v.34, p.175-181, 2012.

SOUZA, R.L.M.; VETORAZZI, M.B.; KOBAYASHI, R.K.; NETO, M.A.A.F. Eugenol como anestésico no manejo de ariacó, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS, 1758). **Revista Ciência Agronômica**, v.46, p.532-538, 2015.

SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.S. Anesthesia, surgery, and related techniques. In: SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. Methods for fish biology. **Bethesda, Maryland: American Fisheries Society**, p. 213-272, 1990.

VELISEK. J.; STARA, A.; LI, Z.; SILOVSKA. S.; TUREK, J. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, v.310, p.369-375, 2011.

VIDAL, L.V.O.; ALBINATI, C.B.; ALBINATI, A.C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, A.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para Tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1069-1074, 2008.

ZAHL I.H.; KIESSLING A.; SAMUELSEN O.B.; HANSEN M.K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v.295, p. 52-59, 2009.

### **CAPÍTULO III**

## **RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DO PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO ACARÁ SEVERO *Heros severus*, ANESTESIADO COM EUGENOL**

Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira  
ISSN 1678-3921

## **Respostas hematológicas e fisiológicas do peixe ornamental amazônico acará severo**

### ***Heros severus*, anestesiado com eugenol**

Bruno César Brito Dias<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Pará, *Campus* Universitário de Bragança, Instituto de Estudos Costeiros, Alameda Leandro Ribeiro, s/nº, CEP 68600-000 Bragança, PA, Brasil. E-mail:

brunorazec@gmail.com

Resumo - Com o trabalho objetivou-se avaliar as respostas hematológicas e fisiológicas de adultos de acará severo anestesiados com o eugenol. Foram utilizados 60 peixes com peso e comprimento médio de  $25,2 \pm 0,86\text{g}$  e  $8,2 \pm 0,12\text{cm}$ , respectivamente. Os peixes foram dispostos de maneira individual em 60 aquários de 60L contendo 45L de água. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, com cinco repetições, sendo o peixe a unidade experimental. Coletou-se sangue dos peixes submetidos a três diferentes protocolos de procedimentos: anestesiado (peixes expostos a  $75 \text{mgL}^{-1}$  de eugenol durante 133s); anestesia simulada e controle. Para cada procedimento, foram realizadas quatro amostragens de sangue em diferentes tempos: 0 (imediatamente após o procedimento), 6, 12 e 24h. A exposição de adultos de acará severo a anestesia com eugenol na concentração ideal de  $75 \text{mgL}^{-1}$  por 133 segundos, foi suficiente para causar alterações nos valores das seguintes variáveis: hematócrito, proteína total, hemoglobina, número de eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, triglicerídeos e colesterol. Os resultados obtidos mostram que, a concentração e o tempo de exposição testados foram suficientes para causar alterações nas variáveis analisadas, desencadeando respostas fisiológicas características do estresse.

Termos para indexação: ciclídeo amazônico, variáveis hematológicas, estresse, anestesia.

## **Histological and physiological responses of ornamental fish Amazonian banded cichlid**

### ***Heros severus*, anesthetized with eugenol**

Abstract - With the work aimed to evaluate the hematological and physiological responses of banded cichlid adults anesthetized with eugenol. To perform the assay was used a total of 60 fish with an average weight and length of  $25.2 \pm 0.86$  g and  $8.2 \pm 0.12$  cm, respectively. The fish were placed individually in 60 aquariums of 60 L containing 45 L of water. To carry out the work was used a completely randomized design in a factorial 3 x 4 with five repetitions, and the fish was the experimental unit. Was collected the blood of fish subjected to three different protocols procedures anaesthetized (fish exposed to 75 mg L<sup>-1</sup> of eugenol during 133 s); simulated anesthesia and control. For each procedure, there were four blood samplings at different times: 0 (immediately after procedure), 6, 12 and 24 h. The banded cichlid adult exposure to anesthesia with eugenol in the ideal concentration of 75 mg L<sup>-1</sup> by 133 seconds was enough to cause changes in the values of variables, hematocrit, total protein, hemoglobin, red blood cell count, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, triglycerides and cholesterol. The results show that the concentration and time of exposure were tested enough to cause changes in the variables analyzed, triggering physiological responses characteristic of stress.

Index terms: Cichlid amazon, hematologic variables, stress, anesthesia.

### **Introdução**

O uso de agentes anestésicos é uma prática comum na aquicultura moderna. Desta forma, é indiscutível a necessidade da utilização dessas substâncias, uma vez que elas permitem a realização de atividades de rotina com muito mais facilidade, evitando injúrias

físicas ao peixe, além de mais conforto e segurança aos manipuladores (Ruane et al., 2002; Acerete et al., 2004; Mylonas et al., 2005).

No entanto, alguns aspectos devem ser observados quanto ao uso de anestésicos, como possíveis efeitos adversos ao uso da substância, como por exemplo, se o mesmo apresenta algum tipo de toxicidade ao manipulador, ao meio ambiente e ao peixe; e se a respectiva concentração é suficiente para indução do peixe ao estágio de anestesia desejado na fase de vida do animal. É importante também levar em consideração as possíveis alterações nos parâmetros de qualidade de água, como depleção nos valores de oxigênio dissolvido; a viabilidade econômica da utilização do anestésico e suas respectivas implicações legais. Além disso, a literatura recomenda que uma substância, para ser considerada um bom anestésico para peixes, deve ser eficiente em concentração muito inferior à considerada letal, induzindo os peixes ao estágio de anestesia profunda e recuperação anestésica dentro dos intervalos de 180 e 300 segundos, respectivamente (Kenne et al., 1998).

Atualmente, muitos produtos químicos são utilizados como anestésicos para peixes, entre eles, os mais comuns são a triclaína metanosulfato (MS-222), a quinaldina e o eugenol (Velisek et al., 2009). O eugenol (metoxifenol 4-alil-2), que tem seu princípio ativo encontrado no óleo de cravo, destaca-se dentre os demais por ser um produto natural, derivado do caule, folhas e flores da árvore *Eugenia caryophyllata*, podendo compreender de 70 a 90% em peso do óleo de cravo. Entre as várias vantagens do uso do eugenol, destaca-se o fato do composto ser facilmente adquirido no mercado, apresentar baixo custo, além de ser seguro para o meio ambiente e o manipulador (Roubach et al., 2005).

Dentre o grande número de espécies amazônicas com potencial para a aquariofilia, destaca-se o acará severo. Segundo a descrição feita por Heckel em 1840, a espécie pertence ao reino Animália, filo Chordata, classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Cichlidae, gênero *Heros* e espécie *Heros severus*. A espécie é encontrada em toda a Amazônia (Brasil),

na Guiana, na Bacia do Orinoco da Venezuela, e na bacia do Tocantins no leste do Brasil (Kullander, 1986). Quando vistos de frente, os indivíduos dessa espécie são fortemente comprimidos lateralmente e olhos são relativamente grandes na lateral da cabeça. Os juvenis apresentam oito bandas negras verticais claramente definidas ao longo do corpo. Quando adultos, após atingirem a maturidade sexual, ocorre uma variação na intensidade da cor. Os machos são mais coloridos, com nadadeiras em tons de vermelho e laranja, assim como a presença de coloração vermelho em mosaico pelo seu corpo.

Embora seja recomendada a utilização de anestésicos para o manejo de peixes, recentes estudos vêm demonstrando alterações fisiológicas e hematológicas, mesmo após os indivíduos alcançarem o estágio de anestesia profunda (Lepic et al., 2014; Pádua et al., 2013; Haseini et al., 2010). Desta forma, com o presente estudo objetivou-se avaliar as respostas fisiológicas e hematológicas de adultos de acará severo anestesiados com eugenol.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais da Faculdade de Engenharia de Pesca do Instituto de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará, *Campus* de Bragança.

Os exemplares do peixe ornamental acará severo (*Heros severus*) utilizados no presente trabalho foram adquiridos da Piscicultura São Tomé, localizada no município de Terra Alta – PA, latitude 01°02'28" sul e longitude 47°54'27" oeste. Os indivíduos foram transportados em sacos plásticos até o laboratório e acondicionados em caixas plásticas de 200L para a adaptação as condições laboratoriais até o dia do presente experimento.

Para realização do ensaio, utilizou-se um total de 60 peixes com peso e comprimento médio de  $25,2 \pm 0,86$ g e  $8,2 \pm 0,12$ cm, respectivamente. Por um período de 15 dias, os peixes foram dispostos de maneira individual em 60 aquários de 60L contendo 45L de água, com

aeração constante e fotoperíodo de 12L:12E. As variáveis de qualidade de água mensuradas neste período foram a temperatura de  $26,77 \pm 1,4$ ; o oxigênio dissolvido de  $5,60 \pm 0,8$ ; o pH  $7,15 \pm 0,7$ ; e a condutividade de  $0,80 \pm 0,05$ .

Neste período, os peixes foram alimentados à vontade, duas vezes por dia, com ração comercial com 40% de proteína bruta. A cada três dias, logo após a última alimentação, 30% da água dos aquários foi cuidadosamente trocada, de forma a preservar as qualidades físico-químicas e biológicas da água. Antes do início do experimento, os peixes foram previamente submetidos a um jejum de 24 horas.

Para escolha da concentração de eugenol utilizada, em experimento prévio, determinou-se a concentração minimamente eficaz ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ) ideal para indução (170 s) e recuperação (288 s) à anestesia profunda de adultos de *H. severus* dentro da faixa de tempo preconizada por Kenne et al. (1998). Assim, para o presente trabalho, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $3 \times 4$ , com cinco repetições, sendo o peixe a unidade experimental. Para verificar a ocorrência da influência do eugenol sobre os parâmetros fisiológicos e hematológicos do acará severo, coletou-se sangue dos peixes submetidos a três diferentes protocolos de procedimentos: anestesiado (peixes expostos a  $75 \text{ mgL}^{-1}$  de eugenol durante 133 segundos); anestesia simulada (peixes submetidos a uma simulação do banho anestésico, também por 133 segundos, somente com água e sem adição do anestésico); e controle (peixes mantidos no aquário sem manuseio e exposição ao anestésico). Para cada procedimento, foram realizadas quatro amostragens de sangue em diferentes tempos: 0 (imediatamente após o procedimento), 6, 12 e 24 horas após cada protocolo.

Nos procedimentos de anestesia e anestesia simulada, os peixes foram expostos individualmente em aquários de ensaio de 20L, contendo 5L de água com temperatura de  $27,20 \pm 0,08 \text{ }^\circ\text{C}$ , oxigênio dissolvido de  $6,26 \pm 0,28 \text{ mgL}^{-1}$ , pH de  $5,65 \pm 0,47$  e condutividade

de  $0,70 \pm 0,05\mu\text{s}$ . Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados por meio da sonda multiparâmetro Horiba (U-10).

As coletas de sangue para a realização das análises hematológicas e fisiológicas foram realizadas em todos os peixes nos diferentes procedimentos (controle, anestesia simulada e anestesiada) e nos respectivos tempos de amostragem (0, 6, 12 e 24 horas).

A retirada da amostra sanguínea foi feita por punção do vaso caudal, com o auxílio de agulhas e seringas de 1ml previamente umedecidas com EDTA a 10%. Cada amostra de sangue foi transferida para microtubos de 1,5ml devidamente etiquetados e armazenados sob refrigeração para a realização das análises de glicose, hematócrito, proteína total, hemoglobina, número de eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média.

Com uma alíquota de  $10\mu\text{L}$  de sangue, determinou-se a glicemia (mg/dL), para a qual foi utilizado um medidor automático (Acon® modelo On Call Plus). O hematócrito (%) foi determinado através do método de microhematócrito em centrífuga a 12 mil rpm por 5min (Quimis® modelo Q222H). Com o plasma obtido após centrifugação dos microcapilares, foi determinado o valor de proteína plasmática total (g/dL), utilizando-se para isso um refratômetro (Quimis®). A taxa de hemoglobina total (g/dL) foi determinada em espectrofotômetro (Bioespectra® modelo SP22) com leitura em comprimento de onda de 540nm utilizando o reagente de Drabkin. A contagem de eritrócitos (número/  $\mu\text{L}$  de sangue) foi realizada em câmara de Neubauer em aumento de 40X com auxílio de microscópio de luz.

Com os resultados da taxa de hemoglobina (Hb), do número total de eritrócitos (Er) e do hematócrito (Ht), calculou-se os seguintes índices hematimétricos absolutos:

- Volume corpuscular médio:  $\text{VCM (fL)} = \text{Ht} \times 10/\text{Er}$
- Hemoglobina Corpuscular Média:  $\text{HCM } (\mu\text{g}) = \text{Hb} \times 10/\text{Er}$

- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média:  $CHCM \text{ (g/dL)} = Hb \times 100/Ht$

O restante do sangue coletado foi centrifugado a 5000rpm por 15 minutos em centrífuga de microtubos (Biovera® modelo RB1) e, em seguida, o plasma foi coletado e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, com o plasma congelado, foram realizadas as análises para determinação das concentrações de colesterol e triglicérides, ambas realizadas por testes colorimétricos (Laboclin®) com leitura em espectrofotômetro (Biospectra® modelo SP22) em comprimento de onda de 510nm.

As variáveis avaliadas foram analisadas por análise de variância de dois fatores e teste de Tukey ( $P<0,05$ ), tendo os procedimentos e os tempos como fatores. As análises estatísticas foram realizadas valendo-se do programa Sisvar (Versão 4.3).

### **Resultados**

Houve influência significativa ( $P<0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, simulação de anestesia e controle) sobre os valores de glicose sanguínea, apresentando o procedimento de anestesia simulada maior valor para esta variável. No entanto, os diferentes tempos de coleta do sangue não influenciaram ( $P>0,05$ ) os valores da glicose no sangue (Tabela 1).

Por outro lado, o hematócrito dos exemplares de acará severo não apresentou diferença estatística ( $P>0,05$ ) com relação aos procedimentos e aos tempos de coleta do sangue (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios para as variáveis glicose, hematócrito (Ht), proteína total (Pt), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (Er), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), colesterol (Col) e triglicerídeos (Tri) de adultos de *Heros severus* em três procedimentos e avaliados em diferentes tempos amostrais.

Tratamento	Glicose (mg/dL)	Ht (%)	Pt (g/dL)	Hb (g/dL)	Er ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	VCM (fL)	HCM (g/dL)	CHCM (g/dL)	Col (mg/dL)	Tri (mg/dL)
<b>Controle</b>	45,35 B	22,56	5,81	7,93 B	1,91 B	113,96 A	41,86 A	37,22 A	180,03	223,02 C
<b>Simulação</b>	50,40 A	22,40	5,98	9,11 A	2,13 AB	107,65AB	43,46 A	40,29 A	151,00	291,08 B
<b>Anestesia</b>	46,03 B	21,50	6,00	6,24 C	2,37 A	99,76 B	27,12 B	27,34 B	180,03	378,18 A
<b>Tempo</b>										
<b>00:00</b>	49,09	22,93	6,02	7,55 AB	2,31	102,64	33,88 B	32,93	167,60	361,58 A
<b>06:00</b>	47,95	21,73	5,88	7,85 AB	2,02	107,34	37,63 AB	35,38	178,93	267,35 B
<b>12:00</b>	46,53	20,87	5,93	7,22 B	2,09	101,84	35,37B	35,36	150,76	277,89 B
<b>24:00</b>	45,47	23,08	5,89	8,42 A	2,13	116,66	43,05 A	36,14	171,29	282,88 B
<b>Procedimento</b>	P=0,0549	P=0,6067	P=0,3243	P=0,0000	P=0,0022	P=0,0430	P=0,0000	P=0,0000	P=0,3152	P=0,0000
<b>Tempo</b>	P=0,5127	P=0,2934	P=0,8192	P=0,0442	P=0,2415	P=0,0880	P=0,0006	P=0,4437	P=0,6345	P=0,0021
<b>Interação</b>	P=0,1766	P=0,6111	P=0,0114	P=0,0020	P=0,0067	P=0,0016	P=0,0000	P=0,0034	P=0,0000	P=0,0024
<b>CV (%)</b>	14,76	16,23	7,42	14,97	18,53	16,20	15,79	16,24	36,38	

Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) e os tempos de amostragem sobre a variável proteína total (Tabela 1). Os diferentes procedimentos influenciaram significativamente os valores de proteína total apenas no tempo 0h, onde os peixes submetidos ao procedimento controle apresentaram menor valor médio para esta variável. Houve influência significativa dos tempos de amostragem do sangue no procedimento de anestesia simulada, onde os peixes amostrados no tempo 0h apresentaram maior valor médio de proteína total no sangue. (Tabela 2).

Interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) e os tempos de amostragem foi demonstrada para a variável hemoglobina (Tabela 1). No procedimento de anestesia, o valor médio da hemoglobina foi menor no tempo 0h em relação aos demais horários de amostragem (6, 12 e 24 horas), que não diferenciaram significativamente entre si. Os valores de hemoglobina sofreram influência significativa dos

procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) nos tempos 0, 6 e 24h, onde os peixes submetidos à anestesia demonstraram menores valores médios de hemoglobina nestes horários (Tabela 2).

Tabela 2 - Desdobramento dos protocolos de procedimento e tempo de amostragem do sangue. Valores médios das variáveis proteína total (Pt), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (Er), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), colesterol (Col) e triglicerídeos (Tri) de adultos de *Heros severus*, avaliados em diferentes procedimentos dentro de cada tempo amostral e o tempo amostral dentro de cada procedimento.

VARIÁVEIS	PROCEDIMENTO	TEMPO (Horas)				VALOR DE P
		0	6	12	24	
<b>Pt</b> (g/dL)	Controle	5,52 Ba	5,84 Aa	6,24 Aa	5,64 Aa	P= 0,0642
	Simulação	6,42 Aa	6,04 Aa	5,68 Aa	5,80 Aa	P= 0,0522
	Anestesia	6,12 Ba	5,76 Aa	5,88 Aa	6,24 Aa	P= 0,3041
	Valor de P	P= 0,0072	P= 0,5849	P= 0,1333	P= 0,0912	
<b>Hb</b> (g/dL)	Controle	8,82 Aa	7,35 Ba	7,35 Aa	8,21 ABa	P= 0,1374
	Simulação	9,54 Aa	9,27 Aa	7,95 Aa	9,68 Aa	P= 0,0874
	Anestesia	4,28 Bb	6,94 Ba	6,35 Aa	7,37 Ba	P= 0,0005
	Valor de P	P= 0,000	P= 0,0057	P= 0,0961	P= 0,0100	
<b>Er</b> (10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> )	Controle	1,99 Aa	1,78 Aa	1,74 Ba	2,11 Ba	P= 0,4010
	Simulação	2,38 Aa	2,13 Aab	2,43 Aa	1,59 Bb	P= 0,0058
	Anestesia	2,55 Aa	2,15 Aa	2,11 Ba	2,68 Aa	P= 0,0616
	Valor de P	P= 0,0784	P= 0,2615	P= 0,0295	P= 0,0003	
<b>VCM</b> (fL)	Controle	111,87 Aa	113,27 Aa	117,13 Aa	113,54 Ba	P= 0,9688
	Simulação	100,68 Ab	98,68 Ab	88,08 Bb	143,16 Aa	P= 0,0000
	Anestesia	95,35 Aa	110,08 Aa	100,30 ABa	93,27 Ba	P= 0,4316
	Valor de P	P= 0,3120	P= 0,3799	P= 0,0360	0,0002	
<b>HCM</b> (g/dL)	Controle	44,36 Aa	42,06 Aa	42,10 Aa	38,92 Ba	P=0,54880
	Simulação	40,32 Ab	37,83 ABb	33,19 ABb	62,50 Aa	P= 0,0000
	Anestesia	16,96 Bb	33,00 Ba	30,82 Ba	27,72 Ca	P= 0,0004
	Valor de P	P= 0,0000	P=0,0612	P=0,0099	P=0,0000	
<b>CHCM</b> (g/dL)	Controle	40,45 Aa	37,18 Aa	36,92 Aa	34,35 Ba	P= 0,4126
	Simulação	40,61 Aa	38,41 Aa	38,07 Aa	44,07 Aa	P= 0,3249
	Anestesia	17,72 Bb	30,56 Aa	31,10 Aa	30,00 Ba	P= 0,0009
	Valor de P	P= 0,0000	P= 0,0710	P= 0,1228	P= 0,0009	
<b>Col</b> (mg/dL)	Controle	84,71 Bb	168,72 Aab	174,12 Aab	254,12 Aa	P= 0,0009
	Simulação	219,74 Aa	188,95 Aa	143,53 Aab	51,76 Bb	P= 0,0004
	Anestesia	198,36 Aa	179,13 Aa	134,63 Aa	207,98 Aa	P= 0,2433
	Valor de P	P= 0,0019	P= 0,8720	P= 0,5606	P= 0,0000	
<b>Tri</b> (mg/dL)	Controle	214,63 Ca	247,61 Aa	272,39 Aa	157,46 Ba	P= 0,0711
	Simulação	378,70 Ba	231,07 Ab	240,00 Ab	314,54 Aab	P= 0,0049
	Anestesia	491,40 Aa	323,37 Ab	321,30 Ab	376,63 Aab	P= 0,0010
	Valor de P	P= 0,0000	P= 0,0960	P= 0,1928	P= 0,0000	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, simulação de anestesia e controle) e os tempos de amostragem do sangue sobre o número de eritrócitos (Tabela 1). A influência do tempo de amostragem do sangue sobre os procedimentos foi significativa apenas nos tempos de 12 e 24 horas. No tempo de amostragem do sangue 12 horas após os procedimentos, o número de eritrócitos foi maior no procedimento de anestesia simulada. Já para o tempo de amostragem de 24 horas, os peixes submetidos ao procedimento de anestesia apresentaram maior valor médio do número de eritrócitos. Apenas no procedimento de anestesia simulada houve influência significativa dos diferentes tempos de amostragem do sangue sobre o número de eritrócitos, onde os peixes amostrados 24 horas apresentaram o menor valor médio do número de eritrócitos (Tabela 2).

Ocorreu interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) e os tempos de amostragem do sangue sobre o volume corpuscular médio (VCM) (Tabela 1). Os procedimentos avaliados influenciaram o VCM apenas nos tempos 12 e 24h. O volume corpuscular médio no procedimento de anestesia simulada aumentou no tempo de amostragem 24h quando comparado aos demais. O tempo amostragem do sangue influenciou o VCM apenas no procedimento de anestesia simulada, demonstrando maior valor desta variável no tempo de amostragem de 24h (Tabela 2).

Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) e os tempos de amostragem do sangue sobre a hemoglobina corpuscular média (HCM) (Tabela 1). A HCM sofreu influência dos procedimentos adotados nos tempos de amostragem 0 e 24h. Em ambos os horários de amostragem a hemoglobina corpuscular média foi menor nos peixes submetidos ao procedimento de anestesia. No procedimento de anestesia simulada, a HCM apresentou maior valor médio no tempo de 24 horas após o procedimento. Já nos peixes submetidos ao procedimento de anestesia, o valor de HCM foi maior no sangue dos peixes coletados imediatamente (0h) após o procedimento (Tabela 2).

Interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) e horários de amostragem do sangue foi demonstrada sobre a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Tabela 1). Os procedimentos influenciaram significativamente a CHCM apenas nos tempos de coleta de 0 e 24h. No tempo 0h de coleta de sangue, o procedimento de anestesia apresentou menor valor médio de CHCM. Por outro lado, no tempo de amostragem de 24h, o procedimento de anestesia simulada apresentou maior valor desta variável. O tempo de amostragem influenciou a variável CHCM apenas no procedimento de anestesia, demonstrando menor valor imediatamente (0h) após o procedimento (Tabela 2).

Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) e do tempo de amostragem do sangue sobre os triglicerídeos (Tabela 1). Os valores de triglicerídeos sofreram influência dos procedimento apenas nos tempos de amostragem 0 e 24h. Em ambos os tempos de amostragem, o valor médio de triglicerídeos foi menor nos peixes submetidos ao procedimento controle. Também houve influência do tempo de amostragem do sangue sobre os valores de triglicerídeos dos peixes submetidos aos procedimentos de anestesia simulada e anestesia, em ambos os procedimentos adotados (anestesia simulada e anestesia) o valor de triglicerídeos foi maior nos peixes amostrados imediatamente após o procedimento (Tabela 2).

Ocorreu interação significativa ( $P < 0,05$ ) dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle) e os tempos de amostragem do sangue sobre o colesterol (Tabela 1). Os valores do colesterol sofreram influência dos diferentes procedimentos apenas nos tempos de amostragem 0 e 24h. No tempo de amostragem 0h, ou seja, imediatamente após os procedimentos, o colesterol apresentou menor valor médio quando submetido ao procedimento controle. Já no tempo de amostragem 24 horas após a realização dos

procedimentos, o valor de colesterol médio foi menor quando os peixes foram submetidos ao procedimento de anestesia simulada (Tabela 2).

### Discussão

Na piscicultura, é de amplo conhecimento que procedimentos como confinamento, perseguição, exposição ao ar, entre outros praticados nos manejos de rotina, atuam como agentes estressores capazes de causar alterações fisiológicas nos peixes, como, por exemplo, a hiperglicemia (De Souza Neves et al., 2014). Desta forma, a glicose é reconhecida como um dos indicadores mais úteis na determinação do estresse em peixes. Como forma de amenizar o efeito de alguns agentes estressores durante os manejos de rotina, a cada dia tem-se tornado mais comum à utilização de anestésicos nestes procedimentos. No presente estudo, os valores de glicose para o procedimento anestesia não diferiram estatisticamente do procedimento controle, demonstrando que a concentração de eugenol utilizada ( $75 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o tempo de exposição (133 segundos), não foram suficientes para promover aumento dos valores de glicose na corrente sanguínea. Esses resultados corroboram os encontrados para juvenis do ciclídeo amazônico, *Geophagus brasiliensis*, anestesiados com eugenol, onde também não houve elevação dos valores de glicose (Rocha et al., 2015). Já o procedimento de anestesia simulada causou elevação nos valores de glicose, provavelmente devido ao catabolismo do glicogênio hepático, demonstrando a eficácia do eugenol em inibir a atuação de um agente estressor de manejo. Por outro lado, em alguns outros experimentos com a utilização do eugenol como anestésico, observou-se a elevação dos valores de glicose dos peixes quando expostos ao fármaco (Simões et al., 2012; Velisek et al., 2009; Deriggi et al., 2006).

O aumento dos valores do hematócrito tem sido descrito como um indicador do estresse em peixes (Sneddon, 2012), uma vez que durante períodos de estresse, a liberação de catecolaminas estimula o baço na produção de eritrócitos, que são lançados na corrente

sanguínea, podendo assim aumentar o hematócrito. No entanto, no presente estudo, nenhum dos procedimentos (anestesia, anestesia simulada e controle), tão pouco os tempos de amostragem, foram capazes de modificar significativamente os níveis de hematócrito. Estes resultados são consistentes com aqueles relatados para outras espécies de peixes como o *Geophagus brasiliensis* (Rocha et al., 2015), *Pseudoplatystoma reticulatum* (Sanches et al., 2014a) e *Piaractus mesopotamicus* (Sanches et al., 2014b). No entanto, outros autores relatam aumentos significativos nos valores do hematócrito para peixes anestesiados com eugenol, como *Oreochromis niloticus* (Simões et al., 2012); *Colossoma macropomum* (Inoue et al., 2011) e *Solea senegalensis* (Weber et al., 2009).

A concentração de proteína total demonstrou ser sensível ao estresse causado pela simulação do processo de anestesia. Os valores de proteína total são alterados principalmente por mudanças no volume plasmático, o aumento é causado por uma mudança de fluido do plasma para o compartimento intracelular e uma diminuição pode ser causada por uma hidratação do plasma (Melo et al., 2009) . A saída dos fluidos do plasma é causada por um desequilíbrio osmótico entre os compartimentos extracelular e intracelular, e qualquer estresse que induz tal desequilíbrio pode levar a um aumento de proteína no plasma (McDonald & Milligan, 1992; Leamaster et al. 1990). No presente trabalho a concentração da proteína total no procedimento de simulação foi superior aos procedimentos controle e anestesia, mostrando que, comparativamente, o procedimento de simulação de anestesia provavelmente ocasionou maior estresse para o acará severo do que os peixes expostos ao eugenol.

A hemoglobina é muito utilizada em estudos fisiológicos como indicador de estresse (Inoue et al., 2011; Simões et al., 2012; Mohammadi & Khara, 2014; Lepic et al., 2014). No presente trabalho, houve aumento no valor da hemoglobina do acará severo nos tempos de amostragem 6, 12 e 24 após o procedimento de anestesia. De maneira similar ao presente estudo, juvenis de *Oreochromis niloticus* anestesiados com óleo de cravo apresentaram

maiores valores de hemoglobina 6 horas após o procedimento de anestesia (Simões et al., 2012). No entanto, resultados diferentes foram demonstrados com juvenis de *Acipenser baeri* (Gomulka et al., 2008) e *Vimba vimba* (Lepick et al., 2014), os quais não apresentaram aumento nos valores da hemoglobina após a utilização do eugenol como anestésico.

Os procedimentos (controle, anestesia simulada e anestesia) afetaram significativamente os valores da hemoglobina, com destaque para o procedimento de simulação de anestesia, o qual apresentou os maiores valores de hemoglobina em todos os tempos amostrados. O aumento da hemoglobina sugere a ocorrência de hemoconcentração em resposta ao estímulo estressante causado pelo procedimento. Dessa forma, o aumento do valor médio de hemoglobina sugere maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue na tentativa de suprir o aumento da demanda energética. (Nikinmaa et al., 1983).

Os procedimentos de simulação de anestesia em adultos de acará severo promoveram o aumento do número de eritrócitos 12 horas após o procedimento. Já os peixes que foram anestesiados com eugenol demonstraram aumento do número de eritrócitos 24 horas após o procedimento. Por outro lado, juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, não apresentaram alterações no número de eritrócitos 24 horas após exposição ao eugenol (Inoue et al., 2011; Pádua et al., 2013). Como no presente trabalho, no qual os maiores valores para o número de eritrócitos ocorreu em 24 horas após os procedimento de anestesia, também foram demonstradas alterações nos valores do eritrócito para *Carassius auratus* (Abdolazizi et al., 2011), tuvira, *Gymnous aff. inaequilabiatus*, (Pádua et al., 2012) e para o esturjão russo, *Acipenser gueldensaedtii*, anestesiados com eugenol (Gomulka et al., 2015). O aumento no número de eritrócitos está associado à presença de catecolaminas liberadas durante as respostas primárias ao estresse. Estes hormônios promovem aumento da taxa ventilatória; do fluxo sanguíneo nas lamelas branquiais; da captação de oxigênio e da capacidade de difusão e transporte de oxigênio pelo sangue (Oba et al., 2009). Assim, a presença de catecolaminas na

corrente sanguínea acaba por estimular a contração esplênica, aumentando, desta forma, a liberação de eritrócitos na corrente sanguínea (Soldatov et al., 1996; Mariano et al., 2009).

Segundo Tavares-Dias & Moraes (2004), após exposição a agentes estressores, os peixes podem apresentar alterações no hemograma, ou seja, alterações nas concentrações de hemoglobina, hematócrito ou contagem de eritrócitos, indicando a ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição, devido à disfunção osmorregulatória. A hemoglobina parece ter sido a responsável pelos valores baixos apresentados pelo VCM, HCM E CHCM no procedimento anestesia, uma vez que os valores de hemoglobina apresentados por esse procedimento foram os menores quando comparados aos demais (controle e anestesia simulada).

Normalmente, o aumento do número de eritrócitos na corrente sanguínea resulta em hemácias com menor volume corpuscular médio (VCM), uma vez que novas células estão sendo recrutadas para auxiliar na demanda pelo transporte de oxigênio. A diminuição no valor do VCM para o procedimento anestesia está relacionada ao aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos em razão de distúrbio de permeabilidade da membrana destas células pelo uso dos anestésicos, como observado em estudos de espécies de peixes tropicais que evidenciaram as mesmas alterações (Tavares-Dias et al., 2008; Inoue et al., 2011).

No presente trabalho, apesar do baixo tempo de exposição dos peixes aos anestésicos, houve redução dos níveis de hemoglobina, da CHCM e do VCM, o que induziu a um quadro hematológico semelhante ao observado em juvenis de tambaqui anestesiados com óleo de cravo (Pádua et al., 2013). A redução dessas variáveis foi também observada em mamíferos em decorrência dos efeitos adversos dos tratamentos alopáticos e de intoxicação por produtos químicos (Weiss et al., 2010). Estudo com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao eugenol corrobora com a presente pesquisa com acará severo, no qual ocorreu aumento nos valores dos eritrócitos e diminuição da CHCM (Tort et al., 2002). Por outro lado, os

resultados encontrados no presente trabalho diferem de alguns outros relatados na literatura, nos quais não foram demonstradas alterações nos valores do VCM, HCM e CHCM de diversas espécies de peixes anestesiadas com óleo de cravo e ou eugenol como, *Colossoma macropomum* (Inoue et al., 2011), *Chama striatus* (Jeyasheela et al., 2014), *Vimba vimba* (Lepic et al., 2014) e *Acipenser baerii* (Gomulka et al., 2015).

Quando comparado os valores de triglicerídeo e colesterol dos procedimentos anestesia e anestesia simulada, os resultados mostram valores superiores aos apresentados no procedimento controle, demonstrando que tanto os triglicerídeos como o colesterol sofreram alterações em seus valores frente às situações estressantes impostas pelos procedimentos. Peixes em situações de estresse liberam catecolaminas e o cortisol, que por consequência levam a alterações bioquímicas e fisiológicas, conhecidas como respostas secundárias ao estresse (Oba et al., 2009). Alguns dos efeitos característicos do aumento das catecolaminas são a depleção das reservas energéticas, aumento do catabolismo de proteína muscular e alterações nos níveis plasmáticos de aminoácidos, ácidos graxos livres e colesterol (Pickering & Pottinger, 1995; Milligan, 2003; Martins da Rocha et al., 2004).

Normalmente, os níveis plasmáticos de triglicerídeos são elevados após a alimentação, quando os lipídeos são absorvidos pelo intestino e transportado para o fígado para processamento (Sheridan, 1988). No presente trabalho, os peixes não foram alimentados no período de 24 horas antes do início do experimento. Portanto, a elevação inicial dos valores de triglicerídeos, seguido pela diminuição nos tempos seguintes de amostragem, sugere a utilização dos triglicerídeos para o restabelecimento da homeostase, frente situações estressantes impostas nos procedimentos de anestesia e simulação de anestesia. Elevação dos valores de triglicerídeos em peixes anestesiados com eugenol são relatados para juvenis de esturjão sibiano *Acipenser baerii* (Gomulka et al., 2008; Feng et al., 2011) e o catfish europeu *Silurus glanis L.* (Velisek et al., 2006).

A elevação dos valores de colesterol nos tratamentos anestesia simulada e anestesia no tempo 0h (pós procedimento), provavelmente está associada a elevação nos valores do hormônio do estresse, o cortisol. Mesmo que o referido hormônio não tenha sido mensurado no presente trabalho, a elevação dos valores séricos do colesterol ao aumento do cortisol já foi constatado previamente (Shankar & Kulkarni, 2007). Isto porque nos peixes teleósteos, a resposta endócrina ao estresse é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (Wendelaar Bonga, 1997), que conduz a um aumento nos glicocorticóides (cortisol), sendo o colesterol utilizado como substrato biológico. No entanto, não se observou variação nos valores do colesterol de juvenis de esturjão siberiano, *Acipenser baerii*, quando os peixes foram anestesiados com eugenol por 10 minutos na concentração de  $160 \text{ mgL}^{-1}$

Desta forma, vale ressaltar a importância dos aspectos relacionados à fisiologia de cada espécie, onde indivíduos de espécies diferentes podem responder de maneira distinta aos agentes estressores. Assim, mesmo frente a agentes estressores severos, algumas espécies podem se mostrar mais resistentes, não apresentando respostas características do estresse, enquanto outras podem mostrar-se mais sensíveis, apresentando respostas fisiológicas rápidas, como apresentado no presente estudo com acará severo expostos ao eugenol.

### **Conclusão**

1- Anestesia com eugenol na concentração de  $75 \text{ mgL}^{-1}$  ocasiona variações nas variáveis hematológicas: hematócrito, proteína total, hemoglobina, número de eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e nas variáveis fisiológicas triglicerídeos e colesterol, alterações essas típicas de peixes em situação de estresse.

### Referências

ABDOLAZIZI, S.; GHADERI, E.; NAGHDI, N.; KAMANGAR, B. B. Effects of clove oil as an anesthetic on some hematological parameters of *Carassius auratus*. **Journal Aquaculture Research & Development**, v.2, p.108-110, 2011.

ACERETE, L.; BALACH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004.

CNAANI, A.; TINMAN, S.; AVIDAR, Y.; RON, M.; HULATA, G. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. **Aquaculture Research**, v.35, p.1434-1440, 2004.

DE SOUZA NEVES, M.; BARBAS, L. A. L.; FUJIMOTO, R. Y. Haematology and recovery response in jacunda, *Crenicichla saxatilis* (Linnaeus, 1758) after short-term handling stress, **Journal of Applied Ichthyology**, v.30, p.42-47, 2014.

DERIGGI, G. F.; INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus): Assessment of eugenol as an alternative anesthetic. **Acta Scientiarum**, v.28, p.269-274, 2006.

FENG, G.; ZHUANG, P.; ZHANG, L.; KYNARD, B.; SHI, X.; DUAN, M.; LIU, J.; HUANG, X. Effect of anaesthetics MS-222 and clove oil on blood biochemical parameters of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Journal of Applied Ichthyology**, v.27, p.595-599, 2011.

GOMUŁKA, P.; DAĞOWSKI, J.; WŁASOW, T.; SZCZEPKOWSKI, M.; CZERNIAK, E.; ZIOMEK, E.; SZCZERBOWSKI, A.; ŁUCZYŃSKI, M.; SZKUDLAREK, M. Haematological and Biochemical Blood Profile in Russian Sturgeon Following Propofol and Eugenol Anaesthesia. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.15, p.13-17, 2015.

GOMULKA, P.; WLASOW, T.; VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; CHMIELINSKA, E. Effects of eugenol and MS-222 anaesthesia on Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt. **Acta Veterinaria Brno**, v.77, p.447-453, 2008.

HOSEINI S.M.; HOSSEINI S.A.; NODEH A.J. Serum biochemical characteristics of Beluga, *Huso huso* (L.), in response to blood sampling after clove powder solution exposure. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.37, p.567-572, 2010.

INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L.; RIBEIRO, P. T.; SILVA, A. M. D.; AFFONSO, E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui expostos ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, v.41, p.327-332, 2011.

JEYASHEELA, P.; HANIFFA, M. A.; KAVITHA, K. Anesthetic efficacy of clove oil and its impact on hematological and biochemical changes in *Channa striatus* (Bloch, 1793). **Journal of Research in Biology**, v.4, p.1595-1603, 2014.

KEENE, J.I.; NOAKES, D.I.G.; MOCCIA, R.D.; SOTO, C.G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.29, p.89-101, 1998.

KULLANDER, S.O. **Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru**. Swedish: Museum of Natural History, 1986. 431p.

LEAMASTER, B. R.; BROCK, J. Q.; FUJIOKA, R. S.; NAKAMURA, R. M. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.97, p.525-529, 1990.

LEPIC, P.; STARA, A.; TUREK, J.; KOZAK, P.; VELISEK, J. The effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in vimba bream, *Vimba vimba*. **Veterinarni Medicina**, v.59, p.81-87, 2014.

MARIANO, W. S.; OBA, E. T.; SANTOS, L. R. B.; FERNANDES, M. N. Respostas fisiológicas de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) expostos ao ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, p.210-223, 2009.

MARTINS DA ROCHA, R.; CARVALHO, E. G.; UBINATI, E. C.; Physiological response associated whit capture and crowding stresse in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Aquaculture research**, v.35, p.245-249, 2004.

McDONALD, D. G.; MILLIGAN, C. L. Chemical properties of the blood. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARREL, A. P. **Fish Physiology**. San Diego: Academic, 1992. p.55-134.

MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; MELO, M. M.; JÚNIOR, D. V.; TEIXEIRA, E. A.; GUIMARÃES, S. R. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*),

submetida ao estresse crônico por hipóxia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1183-1190, 2009.

MILLIGAN, C. L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792. **Journal Exp. Biology**, v.206, p.3167-3173, 2003.

MOHAMMADI, M; KHARA, H. Effect of different anesthetic agents (clove oil, tricaine methanesulfonate, ketamine, tobacco) on hematological parameters and stress indicators of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792. **Comparative Clinical Pathology**, v.24, p.1039-1044, 2014.

MYLONAS, C.C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v.246, p.467-481, 2005.

NIKINMAA, M.; SOIVIO, A.; NAKARI, T.; LINDGREN, S. Hauling stress in brown trout (*Salmo trutta*): physiological responses to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackish water. **Aquaculture**, v.34, p.93-99, 1983.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p.226-247.

PÁDUA, S. B.; NETO, J. D.; SAKABE, R.; CLAUDIANO, G. S.; CHAGAS, E. C.; PILARSKI, F. Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1171-1174, 2013.

PÁDUA, S. B.; VENTURA, A. S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M. M.; HISANO, H.; ROTTA, M. A.; ARANTES, F. C. Respostas hematológicas em Tuvira após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, p.181-188, 2012.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. **Environmental and ecological biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1995. p.349-379.

ROCHA, A. F.; STECH, M. R.; PINHEIRO, M. F. M.; PAGANI, D. M.; SUKEKAVA, C. F. Use of eugenol as an anaesthetic for *Geophagus brasiliensis* juveniles. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.41, p.795–802, 2015.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. Eugenol as efficacious anaesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.36, p.1056-1061, 2005.

RUANE, N.M.; CARBALLO, E.C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio*. **Aquaculture Research**, v.33, p.777-784, 2002.

SANCHEZ, M. S. S.; RODRIGUES, R. A.; NUNES, A. L.; DA SILVA OLIVEIRA, A.vM.; FANTINI, L. E.; de CAMPOS, C. M. Respostas fisiológicas de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum* submetidos a anestésicos naturais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, p.1061-1070, 2014b.

SANCHEZ, M. S. S.; RODRIGUES, R. A.; NUNES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. S.; FANTINI, L. E.; CAMPOS, C. M. Efeito do mentol e eugenol sobre as respostas fisiológicas do pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, p.2799-2808, 2014a.

SHANKAR, D. S. & KULKARNI, R. S. Tissue cholesterol and serum cortisol level during different reproductive phases of the female freshwater fish *Notopterus notopterus* (Pallas). **Journal of Environmental Biology**, v. 28, p.137-139, 2007.

SHERIDAN, M. A. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.90, p.679-690, 1988.

SIMÕES, L. N.; GOMIDE, A. T. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; GOMES, L. C. O. Uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, v.34, p.175-181, 2012.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v.21, p.32-43, 2012.

SODATOV, A. A. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study. **Journal Fish Biology**, v.48, p.321-328, 1996.

TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E. G.; OLIVEIRA, S. R.; MARCON, J. L.; EGAMI, M. I. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. **Acta Amazonica**, v.38, p.799-806, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto, 2004. 144p.

TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v.33, p.907-910, 2002.

VELISEK, J.; WLASOW, T; GOMULKA, P; SVOBODOVA, Z.; NOVOTNY, L.; ZIOMEK, E. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta Veterinaria Brno**, v.75, p.99-106, 2006.

VELISEK, J.; STEJSKAL, V.; KOURIL, J.; SVOBODOVA, Z. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. **Aquaculture Research**, v.40, 354-361, 2009.

WEBER R. A.; PEREZ-MACEIRA J. J.; PELETEIRO J. B.; GARCIA-MARTIN L, ALDEGUNDE M. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v.321, p.108-112, 2011.

WEBER, R. A.; PELETEIRO, J. B.; GARCÍA MARTÍN, L.O; ALDEGUNDE, M. The efficacy of 2- phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, v.288, p.147-150, 2009.

WEISS, D.J.; WARDROP, J.; SCHALM, O.W. **Veterinary hematology**. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. 1206p.